

**Schwerkraftwahrnehmung des Ciliaten *Stylonychia mytilus*:
Elektro- und verhaltensphysiologische Untersuchungen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Martin Krause

aus

Wanne-Eickel

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Herr Prof. Dr. H. Bleckmann

2. Referent: Frau PD Dr. R. Hemmersbach

Tag der Promotion: 05. Juni 2003

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	SCHWERKRAFT ALS REIZ	1
1.2.	GRUNDLAGEN DER SCHWERKRAFTWAHRNEHMUNG	3
1.2.1.	Einzeller als Modellorganismen	3
1.2.2.	Elektrophysiologie von Ciliaten	4
1.2.3.	Grundlagen der Mechanorezeption	9
1.2.4.	Theorien zur Schwerkraftwahrnehmung	12
1.3.	FRAGESTELLUNG	18
2.	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1.	DIE VERSUCHSZELLE <i>STYLONYCHIA MYTILUS</i>	19
2.2.	KULTIVIERUNG	20
2.3.	VERHALTENSPHYSIOLOGISCHE VERSUCHSBEDINGUNGEN	21
2.3.1.	Versuchskammern	22
2.3.2.	Videoanalyse	23
2.3.3.	Einfachapparatur	23
2.3.4.	Fallturm Bremen	24
2.3.5.	Fallturmapparaturen	24
2.3.6.	Versuche bei reduzierter Schwerkraft	25
2.3.7.	Zentrifuge (CECILIA).....	25
2.3.8.	Versuche bei erhöhter Schwerkraft in vertikaler Kammer	29
2.3.9.	Versuche bei erhöhter Schwerkraft in horizontaler Kammer	29
2.3.10.	Versuche zur Nachwirkung von erhöhter Schwerkraft.....	32
2.3.11.	Datenerfassung	32
2.3.12.	Immobilisierung	34
2.3.13.	Adaptationsversuche	35
2.3.14.	Stoßversuche	36
2.4.	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE VERSUCHSBEDINGUNGEN	37
2.4.1.	Elektrophysiologischer Messplatz.....	37
2.4.2.	Versuchsvorbereitung.....	39
2.4.3.	Auswertung	40
2.4.4.	Konstantstrominjektion	40
2.4.5.	Spannungsklemme.....	40
2.4.6.	Mechanostimulation	41

2.4.7.	Ableitung von Gravirezeptorpotentialen	43
2.5.	GRÖßENVERMESSUNG	44
2.6.	STATISTIK	44
3.	ERGEBNISSE.....	50
3.1.	GRÖßENVERMESSUNG	50
3.2.	VERHALTENSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	53
3.2.1.	Sedimentationsgeschwindigkeit	53
3.2.2.	Adaptation an unterschiedliche Experimentierlösungen	57
3.2.3.	Stoßversuche	61
3.2.4.	Verhalten unter normaler Erdbeschleunigung	63
3.2.5.	Verhalten bei erhöhter Beschleunigung	65
3.2.6.	Nachwirkungen erhöhter Beschleunigung.....	72
3.2.7.	Versuche bei variierter Zentrifugalbeschleunigung.....	75
3.2.8.	Verhalten in Schwerelosigkeit.....	78
3.3.	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	84
3.3.1.	Konstantstrominjektion	84
3.3.2.	Spannungsklemme.....	89
3.3.3.	Membraneigenschaften von <i>Stylonychia mytilus</i>	92
3.3.4.	Mechanosensitivität.....	93
3.3.5.	Gravirezeptorpotentiale	97
4.	DISKUSSION.....	107
4.1.	VERHALTENSANALYSE VON <i>STYLONYCHIA</i>	107
4.2.	SEDIMENTATION VON <i>STYLONYCHIA</i>	110
4.3.	SCHWERKRAFTWAHRNEHMUNG VON <i>STYLONYCHIA</i>	114
4.3.1.	Gravorientierung bei Erdbeschleunigung.....	114
4.3.2.	Gravikinese bei Erdbeschleunigung	118
4.3.3.	Verhalten bei erhöhter Beschleunigung	121
4.3.4.	Evolutionäre Aspekte der Schwerkraftwahrnehmung	127
4.3.5.	Verhalten bei erniedrigter Beschleunigung	128
4.3.6.	Auswirkungen der Zentrifugalbeschleunigung.....	132
4.3.7.	Schwerkraftunabhängiger Vortrieb	136
4.3.8.	Nachwirkungen erhöhter Beschleunigung.....	136
4.3.9.	Stoßversuche	138
4.4.	ELEKTROPHYSIOLOGIE VON <i>STYLONYCHIA MYTILUS</i>	140

4.4.1.	Durchführung der Messungen	140
4.4.2.	Elektrophysiologische Eigenschaften von <i>Stylonychia</i>	141
4.5.	MECHANOSENSITIVITÄT VON <i>STYLONYCHIA</i>	144
4.5.1.	Anordnung der mechanosensitiven Kanäle	144
4.5.2.	Auswirkungen der Kanalverteilung auf das Bewegungsverhalten	146
4.6.	GRAVIREZEPTORPOTENTIALE	148
4.6.1.	Messung der schwerkraftabhängigen Potentialänderungen.....	148
4.6.2.	Auswirkungen des Rezeptorpotentials	153
4.7.	SCHLUSSBETRACHTUNG: SCHWERKRAFTWAHRNEHMUNG BEI CILIATEN	153
5.	ZUSAMMENFASSUNG	155
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	157
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	169
	ANHANG.....	170
	TABELLENVERZEICHNIS	171
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	172
	DANKSAGUNG.....	174
	LEBENS LAUF	175

1. Einleitung

1.1. Schwerkraft als Reiz

Die Fähigkeit zur Motilität zählt neben Stoffwechsel, Wachstum und Vermehrung zu den Kennzeichen eines lebenden Systems. Ein wesentlicher evolutiver Vorteil von Bewegungsprozessen, wie ein gerichtetes Wachstum bei Pflanzen oder eine aktive Lokomotion von Organismen, ergibt sich in Verbindung mit der Bewertung unterschiedlicher Umweltparameter. Kann der Organismus diese Parameter als Reiz wahrnehmen und sie zur Modulation des Bewegungsverhaltens einsetzen, ist er in der Lage, Aufenthaltsräume mit günstigen Umweltbedingung aufzusuchen oder schädliche Umgebungen zu meiden. Die einfachsten Reiz-Bewegungsreaktionen stellen die Taxien dar, die schon auf der niedrigsten Stufe der Evolution zu finden sind (McNab & Koshland, 1972).

Von den zahlreichen Parametern der Umwelt, auf die ein Organismus reagieren kann (z.B. Licht, chemische Gradienten, Temperatur), unterscheidet sich die Massenanziehungskraft der Erde (Schwerkraft) wesentlich:

- Schwerkraft ist ein Vektor, dessen Richtung und Betrag für die Erfahrungswelt von Lebewesen quasi konstant sind
- Schwerkraft kann nicht abgeschirmt werden, sie wirkt ständig auf Organismen ein. Ihre physikalische Kompensation ist nur durch artifiziell herbeigeführte, für die Evolution nicht wirksame Bedingungen möglich.

In den letzten Jahrzehnten konnte eine Schwerkraftwahrnehmung bei zahlreichen biologischen Systemen, wie z.B. Zellen der Wurzelhaube bei Pflanzen (Sievers & Volkmann, 1979), Osteoblasten (Hughes-Fulford & Lewis, 1996), Lymphozyten (Lewis, 2002) experimentell bestätigt werden. Bei dem Ciliaten *Paramecium* wurde bereits Ende des vorletzten Jahrhunderts eine schwerkraftabhängige Ak-

kumulation in der oberen Hälfte eines Versuchsgefäßes nachgewiesen (Verworn, 1889) und als Geotaxis bezeichnet. Da dieses Verhalten auf die Wirkung der Gravitation zurückzuführen ist, wird inzwischen der Begriff Gravitaxis bevorzugt angewendet. Eine Gravitaxis ist das Ergebnis einer orientierten Bewegung von Lebewesen in Bezug auf die Richtung des Schwerkraftreizes. Zur Gravitaxis tragen eine richtende Komponente (Graviorientierung) und eine kinetische Komponente bei. Bei einer negativen Gravitaxis ist das Vorderende der Zelle nach oben (d.h. der Richtung des Schwerkraftvektors entgegen) ausgerichtet, so dass sich die Zelle antiparallel zum Schwerkraftvektor fortbewegt. Eine positive Gravitaxis führt zu einer Akkumulation der Zellen am Boden des Versuchsgefäßes.

Schwerkraft als Reiz ermöglicht den Zellen folglich eine räumliche Orientierung. Durch eine derartige Orientierung kann einer wesentlichen Wirkung der Schwerkraft entgegengewirkt werden: der Sedimentation. Ein frei schwimmender Einzelzeller, dessen Dichte höher ist als die des umgebenden Mediums, würde ohne sedimentationskompensierende Mechanismen langsam absinken und seinen bevorzugten Lebensraum verlassen.

Bei der Untersuchung der Graviperzeption zellulärer Systeme stellt sich die Frage, wie ein Organismus den Reiz Schwerkraft wahrnimmt. Welche Zellstrukturen sind an der Reizaufnahme beteiligt? Wie sind die einzelnen Schritte der Reizverarbeitung angeordnet und welche Reaktionen stehen am Ende der Transduktionskette? Darüber hinaus gilt es zu klären, ob ein Organismus an den Reiz Schwerkraft adaptieren kann und welche kurz- und langfristigen Effekte der Wegfall von Schwerkraft auf das System hat. Letzteres wird, auch im Hinblick auf die bemannte Raumfahrt, in den nächsten Jahren ein Schwerpunkt der gravitationsbiologischen Forschung sein. Um die genannten Fragen zu beantworten, ist es notwendig, Modellorganismen zu finden, an denen die Mechanismen der Schwerkraftwahrnehmung und die anschließenden Prozesse untersucht werden können.

1.2. Grundlagen der Schwerkraftwahrnehmung

1.2.1. Einzeller als Modellorganismen

Bei mehrzelligen Organismen sind Reizaufnahme und -verarbeitung an spezialisierte, meistens räumlich getrennte Gewebe gebunden, was zu komplexen und schwer erfassbaren Zusammenhängen führt. Bei Protozoen kann dagegen die Reiztransduktion an einer einzelnen Zelle in wesentlichen Schritten untersucht werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der leichten Vermehrbarkeit von Einzellern und in der dadurch gegebenen Möglichkeit einer Massenkultivierung. Durch die gleichzeitige Untersuchung hunderter von Zellen werden statistische Analysen und damit zuverlässigere Aussagen über Verhaltensänderungen möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Schwerkraftwahrnehmung des hypotrichen Ciliaten *Stylonychia mytilus* untersucht. Im Folgenden soll dargestellt werden, warum Einzeller, im Besonderen Ciliaten, für die Untersuchung der Graviperzeption geeignet sind.

Bei Ciliaten mit einer aktiven Fortbewegung wirkt sich die Wahrnehmung eines Reizes über eine Änderung des Membranpotentials direkt auf das Bewegungsverhalten aus. Die dem zu Grunde liegende spannungsabhängige Modulation der Cilienaktivität wird als elektromotorische Kopplung bezeichnet (Machemer, 1986). Umgekehrt ist es durch die elektromotorische Kopplung möglich, auf Grund der Beobachtung des Bewegungsverhaltens, Rückschlüsse auf den Erregungszustand des Einzellerns zu ziehen.

Protisten stellen unter den Eukaryoten die stammesgeschichtlich älteste Gruppe dar. Sie eignen sich daher zur Untersuchung konservativer Zellstrukturen und Signaltransduktionsketten. Auf Grund der Annahme, dass sich Strukturen, wie beispielsweise membrangebundene Proteine, ribosomale RNA, bestimmte Enzyme und cytoskeletale Elemente, im Verlauf der Evolution unwesentlich verändert haben, können die Untersuchungsergebnisse auf höhere Systeme übertragen wer-

den. Im Rahmen dieses Forschungsbereiches wurden zahlreiche genetische Studien durchgeführt (zur Übersicht: Dessen et al., 2001).

In der Vergangenheit wurden Untersuchungen zum Verhalten von Ciliaten in Bezug auf verschiedene Reizmodalitäten durchgeführt. Hierzu zählen Experimente zur Photorezeption (Iwatsuki & Naitoh, 1982; Nakaoka et al., 1987; Kuhlmann, 1993), zur Reaktion auf chemische Reize (Dryl, 1963; van Houten et al., 1975), zur Einwirkung elektromagnetischer Felder (Hemmersbach et al., 1997b; Wilczek, 2001) und zur Schwerkraftwahrnehmung (Ooya et al., 1988; Machemer et al., 1991; Hemmersbach-Krause et al., 1991; Bräucker et al., 1994). Neben verhaltensphysiologischen Untersuchungen wurden auch biochemische und zellphysiologische Analysen der Reiztransduktion an Ciliaten veröffentlicht (Hinrichsen & Schultz, 1988; Plattner & Klauke, 2001).

Kenntnisse über die Mechanismen der Lokomotion von Einzellern und ihre Steuerung durch elektrophysiologische und biochemische Prozesse beruhen auf der Aufklärung der Funktion von Cilien und Flagellen mit Hilfe bildtechnischer, elektronenmikroskopischer und biophysikalischer Methoden (Machemer, 1974; Satir, 1973; Brokaw, 1972).

Typische Zelllängen von Ciliaten reichen von 50 μm (*Tetrahymena spec.*) bis 800 μm (*Bursaria truncatella*). Dies erleichtert elektrophysiologische Untersuchungen, da intrazelluläre Glasmikroelektroden gut platzierbar sind (Naitoh & Eckert, 1972; Machemer, 1988).

1.2.2. Elektrophysiologie von Ciliaten

In einer lebenden Zelle stellt das Membranpotential einen zentralen Steuerungsmechanismus dar. So sind beispielsweise die Aufrechterhaltung von Ionengradienten, die Aufnahme von Reizen, die Steuerung spannungsabhängiger Ionenkanäle und die Fortbewegung mit Hilfe von Flagellen oder Cilien bei Einzellern an das Membranpotential gekoppelt. Das Membranpotential (V_m) einer Zelle hängt von der Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen und von deren unter-

schiedlicher Konzentration zu beiden Seiten der Membran (Außenmedium, Zellinnenraum) ab. Das dadurch entstehende Gleichgewichtspotential kann nach der Nernst'schen Gleichung (I.a, $[X]_a$: Ionenkonzentration Medium, $[X]_i$: Ionenkonzentration Cytoplasma, z : Wertigkeit von X) berechnet werden:

$$(I.a) \quad E_x = \frac{58 \text{ mV}}{z} \cdot \log \frac{[X]_a}{[X]_i}$$

Die Permeabilität der Membran wird hauptsächlich durch die Leitwerte der in die Zellmembran inkorporierten Kanalproteine bestimmt. Bei den bisher untersuchten Ciliaten sind es im Wesentlichen die Gleichgewichtspotentiale (E_{Ca} , E_K) und Leitwerte (g_{Ca} , g_K) für Calcium- und Kaliumionen, die das Membranpotential bestimmen.

Die Abhängigkeit des Membranpotentials von Membranleitwerten und Gleichgewichtspotentialen wird durch die Hodgkin-Horowicz-Gleichung beschrieben (I.b). Änderungen des Membranpotentials resultieren aus einer Variation der Öffnungswahrscheinlichkeit der Ionenkanäle oder aus Veränderungen von Gleichgewichtspotentialen. An länger andauernde Änderungen der extrazellulären Ionenkonzentrationen können Zellen adaptieren, indem Ionenkanäle geöffnet oder deren Anzahl variiert werden (Oka et al., 1986).

$$(I.b) \quad V_m = E_{Ca} \cdot \frac{g_{Ca}}{g_K + g_{Ca}} + E_K \cdot \frac{g_K}{g_{Ca} + g_K}$$

Ähnlich wie beispielsweise bei Nervenzellen ist die Zellmembran von Ciliaten im Ruhezustand vorwiegend für Kaliumionen permeabel, so dass das Ruhepotential hauptsächlich auf dem Kaliumgleichgewichtspotential beruht.

Der Kehrwert der Summe aller Membranleitwerte bestimmt den Eingangswiderstand (R_E) der Zelle. Dieser nimmt, bei konstantem spezifischen Membranwiderstand, mit zunehmender Zellgröße ab. Die Eingangskapazität (C_E) beschreibt die

Fähigkeit der Membran, Ladungen zu trennen. Ihr Wert kann über die Zeitkonstante (τ) passiver Potentialänderungen berechnet werden (Gleichung I.c):

$$(I.c) \quad \tau = C_E \cdot R_E$$

Gegenüber dem Eingangswiderstand ist der Innenwiderstand des Cytoplasmas gering. Auf Grund der daraus resultierenden relativ hohen Längskonstante (4,7 mm bei *Paramecium*; Machemer, 1988) kann eine Ciliaten-Zelle als isopotential angesehen werden. Lokale Erregungen breiten sich daher schnell und mit vernachlässigbarem Verlust ihrer Amplitude über die Zelle aus.

Die Bildung von Aktionspotentialen ist bei den bisher untersuchten Ciliaten auf eine Leitwerterhöhung spannungsabhängig öffnender Calciumkanäle (L-Typ) zurückzuführen (Naitoh & Eckert, 1974; Satow & Kung, 1979). Mit Hilfe von Deciliierungsexperimenten konnte bei *Paramecium* nachgewiesen werden, dass sich diese Kanäle in der Cilienmembran befinden (Dunlap, 1977; Machemer & Ogura, 1979). Ihre Inaktivierung erfolgt in Abhängigkeit einer erhöhten intraciliären Calciumionenkonzentration (Brehm & Eckert, 1978). Die langsame Aktivierungskinetik der Calciumkanäle und eine ohne zeitliche Verzögerung erfolgende Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle führen dazu, dass das Aktionspotential bei *Paramecium* in Abhängigkeit von der Reizstärke graduiert und nicht wie bei Nervenzellen nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip abläuft (Machemer, 1988).

Das Aktionspotential von *Stylonychia mytilus* besteht zusätzlich aus einer nicht graduierten Komponente, die auf das Öffnen niederschwelliger Calciumkanäle (T-Typ) auf den Membranellen zurückgeführt werden kann (de Peyer & Machemer, 1977; Deitmer, 1984). Diese Kanäle inaktivieren spannungsabhängig. Im Vergleich zu anderen Ciliaten generiert *Stylonychia* mit einer relativ hohen Frequenz spontane Aktionspotentiale (Machemer, 1970), die sich mit schnellen Rück-Vor-

Bewegungen (Reversals) der Zelle zeitlich korrelieren lassen (elektromotorische Kopplung).

Durch das Membranpotential werden sowohl die Cilienschlagfrequenz als auch die Richtung des Effektivschlages gesteuert. Bei *Paramecium* führen Hyperpolarisationen zu einer erhöhten Cilienschlagfrequenz und zu einer Drehung der Richtung des Effektivschlages zum posterioren Zellpol hin (Machemer, 1974). Eine Depolarisation bewirkt zunächst eine Erniedrigung der Cilienschlagfrequenz bis hin zur völligen Inaktivierung. Stärkere Depolarisationen führen wieder zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz, dabei wird die Richtung des Effektivschlages mit steigender Depolarisation zum anterioren Zellpol hin verstellt (Machemer, 1974). Im Bewegungsverhalten resultieren aus Hyperpolarisationen erhöhte Vorwärtsschwimmgeschwindigkeiten, Depolarisationen reduzieren die Geschwindigkeit der Zelle zunächst bis zum Stillstand, danach schwimmt die Zelle rückwärts, wobei die Geschwindigkeit mit zunehmender Depolarisation größer wird.

Bei *Stylonychia mytilus* ist die Fortbewegungsweise in Abhängigkeit von einer Membranpotentialänderung wesentlich komplexer. Die Zelle besitzt mehrere, morphologisch voneinander getrennte Gruppen von Cilien (Marginalcirren, Ventralcirren, Frontalcirren, Membranellen), die eine unterschiedliche spannungsabhängige Aktivierungsschwelle haben. In Abbildung 1.1 ist die Aktivität der Marginalcirren in Abhängigkeit vom Membranpotential dargestellt. Im Gegensatz zu den Cilien von *Paramecium* sind die Marginalcirren bei *Stylonychia* während des Ruhepotentials inaktiv. Die Frontalcirren von *Stylonychia* zeigen im Vergleich zu den Marginalcirren erst bei stärkeren Depolarisationen eine Umkehr des Effektivschlages (Deitmer et al., 1983). Diese Cirren sind in erster Linie für das Lokotionsverhalten von *Stylonychia* auf Oberflächen („Laufen“) verantwortlich.

Die adoralen Membranellen, die einen Transport der Nahrungspartikel zum Cytostom gewährleisten, zeigen in Abhängigkeit von De- oder Hyperpolarisationen keine Veränderung der Schlagfrequenz (Deitmer et al., 1983).

Der genaue Transduktionsweg der elektromotorischen Kopplung ist noch nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass Calciumionen den zentralen Mediator zwischen Membranpotentialänderung und Änderung der Cilienaktivität darstellen (Machemer, 1986). Durch den transienten Calciumioneneinstrom während des Aktionspotentials wird die intraciliäre Calciumionenkonzentration von 10^{-7} M auf $>10^{-5}$ M erhöht (Machemer, 1990).

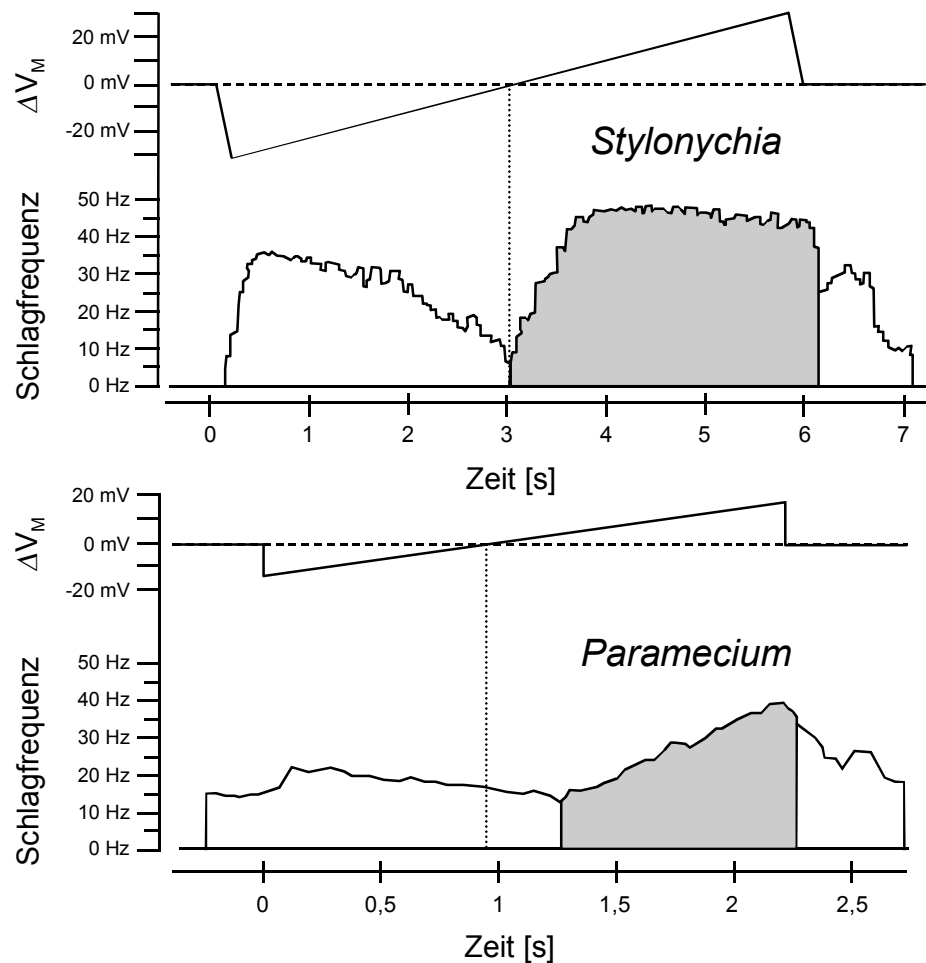


Abb. 1.1: Veränderung der Cilienaktivität bei *Stylonychia* (Marginalcirren) und bei *Paramecium* in Abhängigkeit von Membranpotentialänderungen (ΔV_M , durch Spannungsrampen). Eine Hyperpolarisation führt bei beiden Zellen zu einer Erhöhung der Cilienschlagfrequenz. Die Marginalcirren von *Stylonychia* sind bei Membranruhepotential inaktiv, während die Cilien von *Paramecium* mit etwa 20 Hz in Richtung des posterioren Zellpols schlagen. Eine Depolarisation führt bei *Stylonychia* zu einer Umkehr des Effektivschlages in Richtung des anterioren Zellpols (grauer Bereich). Bei *Paramecium* bewirkt eine Depolarisation zunächst eine Abnahme der Cilienschlagfrequenz; erst stärkere Depolarisationen kehren die Richtung des Effektivschlages um (modifiziert nach Machemer & de Peyer, 1982; verschiedene Zeitachsen beachten).

Es wird vermutet, dass die Calciumionen über eine Calmodulinbindung den mikrotubulären Gleitmechanismus des Axonems beeinflussen (Blum et al., 1980). Bei einer Hyperpolarisation werden Calciumionen durch einen bisher nicht aufgeklärten Mechanismus aus dem Cilium entfernt (Mogami & Machemer, 1991). Da keine hyperpolarisationsabhängig aktivierenden Ionenkanäle in der Cilienmembran bekannt sind, wird angenommen, dass Calciumionen spannungsabhängig durch Proteine oder Pumpen abgefangen bzw. aus dem Cilium transportiert werden (Machemer, 1986).

Cilienschlagrichtung und -frequenz werden unabhängig voneinander, wahrscheinlich über einen Ca-Mg-Antagonismus, gesteuert (Mogami & Machemer, 1990). Ob sekundäre Botenstoffe, wie cAMP oder cGMP, an der Steuerung des Cilienschlages beteiligt sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es kann zwar eine Korrelation zwischen einer Hyperpolarisation der Membran und einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration festgestellt werden (Bonini et al., 1986; Schultz et al., 1984), Versuche in der Spannungsklemme zeigten jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen einer Injektion von cAMP in die Zelle und einer Erhöhung der Cilienschlagfrequenz (Hennessey et al., 1985). Eine langfristige, indirekte Wirkung von cAMP auf die Cilienaktivität ist damit jedoch nicht ausgeschlossen (Izumi & Nakaoka, 1987).

1.2.3. Grundlagen der Mechanorezeption

Ionenkanäle werden auf Grund der Art ihrer Aktivierung in drei Klassen eingeteilt:

- spannungsabhängig aktivierbar,
- ligandengesteuert aktivierbar,
- mechanisch aktivierbar.

Bei der zuletzt genannten Gruppe wird davon ausgegangen, dass mechanische Kräfte zu einer Konformationsänderung des Kanalproteins führen, welches dann durchlässig für eine (spezifisch) oder mehrere Ionenspezies (unspezifisch) wird (Eckert & Randall, 1986). Mechanosensorische Kanäle lassen sich nach der Richtung der zur Kanalöffnung wirksamen Kraft (bezüglich der Membranoberfläche) klassifizieren. So lassen sich Kanäle, die nach einer Dehnung der Membran („stretch activated channels“) öffnen, von Kanälen, bei denen eine senkrecht zur Membranoberfläche wirkende Kraft zur Kanalöffnung führt, trennen (Sokabe & Sachs, 1992).

Bei zahlreichen Einzellern konnte eine Mechanosensitivität experimentell nachgewiesen werden (z.B. *Stentor*: Wood, 1970; *Chlamydomonas*: Yoshimura, 1996; *Didinium*: Hara & Asai, 1980; *Bursaria*: Krause, 1999; *Euplotes*: Krüppel et al., 1993).

Die bisher am genauesten untersuchten Ciliaten, *Stylonychia* und *Paramecium*, zeigen bei lateraler Reizung eine bipolare Verteilung von mechanosensitiven Kanälen auf dem Zellsoma (de Peyer & Machemer, 1978; Ogura & Machemer, 1980). Dabei führt eine Reizung des anterioren Zellpols zu Depolarisationen und eine Reizung des posterioren Zellpols zu Hyperpolarisationen. Eine Beteiligung der Cilien an der Mechanotransduktion konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da Zellen, die vor einer mechanischen Reizung deciliert wurden, nur unwesentliche Veränderungen in den Rezeptorpotentialen zeigten (Ogura & Machemer, 1980).

Die betreffenden mechanosensitiven Ionenkanäle sind entlang der Zelllängsachse gradientenartig über das Zellsoma verteilt. Durch Messen des Umkehrpotentials in der Spannungsklemme bei verschiedenen extrazellulären Ionenkonzentrationen konnte die Ionenabhängigkeit der betreffenden Kanäle bestimmt werden (de Peyer & Deitmer, 1980; Deitmer, 1982). Am anterioren Zellpol sind überwiegend mechanosensitive Calciumkanäle, am posterioren Zellpol überwiegend mechanosensitive Kaliumkanäle in die Zellmembran inkorporiert. Bei einer Reizung in der

Zellmitte (zwischen anterior und posterior) heben sich bei *Paramecium* depolarisierende und hyperpolarisierende Rezeptorpotentiale auf, es resultiert keine Veränderung des Membranpotentials.

Im Unterschied zu anderen Species konnten bei *Didinium nasutum* nur depolarisierende Calcium-Mechanorezeptorkanäle nachgewiesen werden (Hara & Asai, 1980).

Bei *Stylonychia* aktivieren beide Mechanorezeptorkanäle 1-3 ms nach einer Deformation der Membran und inaktivieren nach 10-20 ms. Die Aktivierung erfolgt in Abhängigkeit von der Reizstrecke und der Geschwindigkeit, mit welcher der Stimulator gegen die Membran ausgelenkt wird (Machemer & Deitmer, 1987). Während der posteriore Rezeptor spezifisch für Kaliumionen ist, zeigt der anteriore Rezeptor eine zusätzliche Permeabilität für Magnesiumionen (Deitmer, 1983). Eine Hemmung des posterioren Rezeptors kann durch TEA oder 4-Aminopyridin erfolgen (Deitmer, 1982). Eine spezifische Hemmung der mechanosensitiven Kanäle blieb bislang allerdings erfolglos. Gadolinium, das als potentieller Blocker für „stretch activated channels“ angesehen wird (Lacampagne et al., 1994), zeigt bei *Paramecium tetraurelia* neben einer unvollständigen Inhibierung der Mechanorezeptoren auch einen hemmenden Effekt auf spannungsabhängige Leitwerte (Nagel & Machemer, 2000b).

Über den molekularen Aufbau der mechanosensitiven Kanäle bei Ciliaten gibt es bisher keine Erkenntnisse. Auf Grund von energetischen Überlegungen und pharmakologischen Untersuchungen wird aber davon ausgegangen, dass es sich nicht um „stretch activated channels“ handelt (Machemer et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit soll unter anderem geklärt werden, ob sich die bipolare Verteilung der mechanosensitiven Kanäle auch bei *Stylonychia* auf die gesamte Zelloberfläche, d.h., neben den bereits untersuchten lateralen Membranbereichen (s.o.), auch auf die ventrale und dorsale Membranfläche erstreckt.

1.2.4. Theorien zur Schwerkraftwahrnehmung

Ein sich frei in der Wassersäule fortbewegender Einzeller (dessen spezifisches Gewicht größer als das des umgebenden Mediums ist) hat zwei Möglichkeiten der Schwerkraft entgegenzuwirken:

- Die Fortbewegungsrichtung wird so eingestellt, dass sich die Zelle entgegen dem Schwerkraftvektor bewegt (Gravorientierung). Diese Ausrichtung kann physikalisch oder physiologisch erfolgen.
- Die Fortbewegungsgeschwindigkeit wird moduliert, so dass eine Fortbewegung entgegen dem Schwerkraftvektor mit einer höheren Geschwindigkeit erfolgt und/oder die Abwärtsschwimgeschwindigkeit reduziert wird (Gravikinese). Die aktive Änderung der Lokomotionsrate ist zwingend ein physiologischer Prozess.

In der Literatur werden hierzu unterschiedliche Befunde beschrieben:

a) die Zelle zeigt nur eine Gravorientierung, aber keine Gravikinese

Dieser Fall ist bei dem Flagellaten *Euglena gracilis* beschrieben worden (Häder et al., 1995)¹. Die Autoren gehen davon aus, dass es sich bei der Gravorientierung um einen aktiven Prozess handelt und bezeichnen diesen als Gravitaxis.

b) die Zelle zeigt eine Gravorientierung und eine Gravikinese

Dieser Fall ist für mehrere Ciliaten beschrieben worden. Gravorientierung und Gravikinese können dabei als gemeinsam wirkende Komponenten der Schwerkraftbeantwortung („graviresponse“; Machemer & Bräucker, 1992) angesehen werden.

In der Vergangenheit wurden mehrere Theorien für die Schwerkraftwahrnehmung von Ciliaten aufgestellt, von denen einige hier genannt werden sollen. Ein Teil der

¹ Machemer-Röhnisch et al. beschreiben allerdings eine Gravikinese bei *Euglena* (1999).

Autoren geht dabei von physikalischen Mechanismen der Ausrichtung aus. Eine ungleiche Verteilung der Dichte (Bojenhypothese; Verworn, 1889) oder ein größerer Durchmesser des posterioren Zellpols im Vergleich zum anterioren Zellpol (hydrodynamische Hypothese; Roberts, 1970) sollen dazu führen, dass der posteriore Zellpol schneller sedimentiert als der anteriore. Durch die Wirkung der Schwerkraft wird ein Drehmoment hervorgerufen, das die Zelle negativ gravitatisch ausrichtet. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass immobilisierte Zellen in der Mehrzahl mit dem anterioren Zellpol nach oben ausgerichtet sedimentieren (Nagel, 1998; Watzke, 2000).

Winet und Jahn (1974) postulierten, dass das Antriebszentrum der Zelle weiter anterior liegt als der Schwerpunkt des Zellkörpers. Die sich dadurch ergebenden Reorientierungswinkel konnten aber experimentell nicht bestätigt werden.

Eine andere Hypothese nach Nowakowska und Grebecki (1977) setzt voraus, dass die aktive Vorwärtsbewegung der Zelle in Kombination mit der Sedimentationsgeschwindigkeit zu einer Abweichung zwischen Längsachse der Zelle und Translationsrichtung führt. In Folge dieser Abweichung soll eine Auftriebskraft erzeugt werden. Wenn diese Kraft im vorderen Zellbereich angreift und zu einem Drehmoment führt, würde die Zelle mit dem anterioren Zellpol dem Schwerkraftvektor entgegen aufgerichtet werden. Diese Hypothese wurde von Bean (1984) auf Grund hydrodynamischer Überlegungen (niedrige Reynoldszahl) abgelehnt.

Murakami (1998) geht davon aus, dass die Richtung des effektiven Cilienschlages durch die Wirkung der Sedimentation asymmetrisch und passiv verstellt wird (Rheogravitaxis).

Mit der Annahme eines physiologischen Mechanismus der Graviorientierung ging Davenport (1897) davon aus, dass die Zelle bei ihrer Fortbewegung den Energieverbrauch „misst“. Eine Zelle, deren Dichte höher ist als das umgebende Medium, hat bei einer Abwärtsfortbewegung den geringsten Energieverbrauch. Die Zelle müsste sich dann so orientieren, dass ihr Energieverbrauch maximiert wird.

Die Idee der hydrostatischen Hypothese (Jensen, 1891) liegt darin, dass die Zelle den hydrostatischen Druckgradienten der Wassersäule wahrnehmen kann. Die Zelle würde dann Orte geringeren Druckes aufsuchen.

Die beiden zuletzt genannten Hypothesen konnten von Taneda (1987) experimentell widerlegt werden.

Lyon (1905) griff die Idee einer Wirkung der Dichtedifferenz zwischen Zellinnen- und Zellaußenseite für die Schwerkraftwahrnehmung auf. Mit seiner Statocystenhypothese forderte er, dass die Masse des Cytoplasmas einen Druck auf die jeweils unten liegende Zellmembran ausübt. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von Daten aus elektrophysiologischen Untersuchungen zur Verteilung der Mechanorezeptoren (1.2.3.) präzisiert (Machemer et al., 1991). Je nach Lage der Zelle im Raum werden durch den Druck des Cytoplasmas auf die jeweils untere Membran mechanosensitive Ionenkanäle geöffnet (Abb. 1.2). Bei einer sich aufwärts fortbewegenden Zelle führt das Öffnen von Kaliumkanälen zu einer Hyperpolarisation. Auf Grund der elektromotorischen Kopplung (1.2.2.) resultiert daraus eine Erhöhung der Lokomotionsrate. Im Gegensatz dazu wird eine abwärts orientierte Zelle depolarisiert, da sich in diesem Fall, durch die Kraft des Cytoplasmas, Calciumkanäle öffnen: Die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Zelle wird reduziert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob sich bei *Stylonychia* die orientierungsabhängige Verschiebung des Membranpotentials messen lässt. Die Versuchszelle scheint auf Grund der hohen Mechanosensitivität dafür besonders geeignet zu sein. Frühere Untersuchungen an *Paramecium* haben erste Hinweise auf das Vorliegen eines Gravirezeptorpotentials erbracht (Gebauer et al., 1999). Die gemessenen Amplituden waren jedoch mit 1,5 mV sehr gering.

Eine Veränderung des Membranpotentials hat evt. auch einen Einfluss auf die Häufigkeit spontaner Aktionspotentiale und damit auf die Frequenz spontaner Reversals (=schnelle Rück-Vor-Bewegungen). Untersuchungen an *Stylonychia*

sollen zeigen, ob sich die Reversalrate unter Schwerelosigkeitsbedingungen (kein Rezeptorpotential durch Wegfall der Schwerkraft) signifikant ändert.

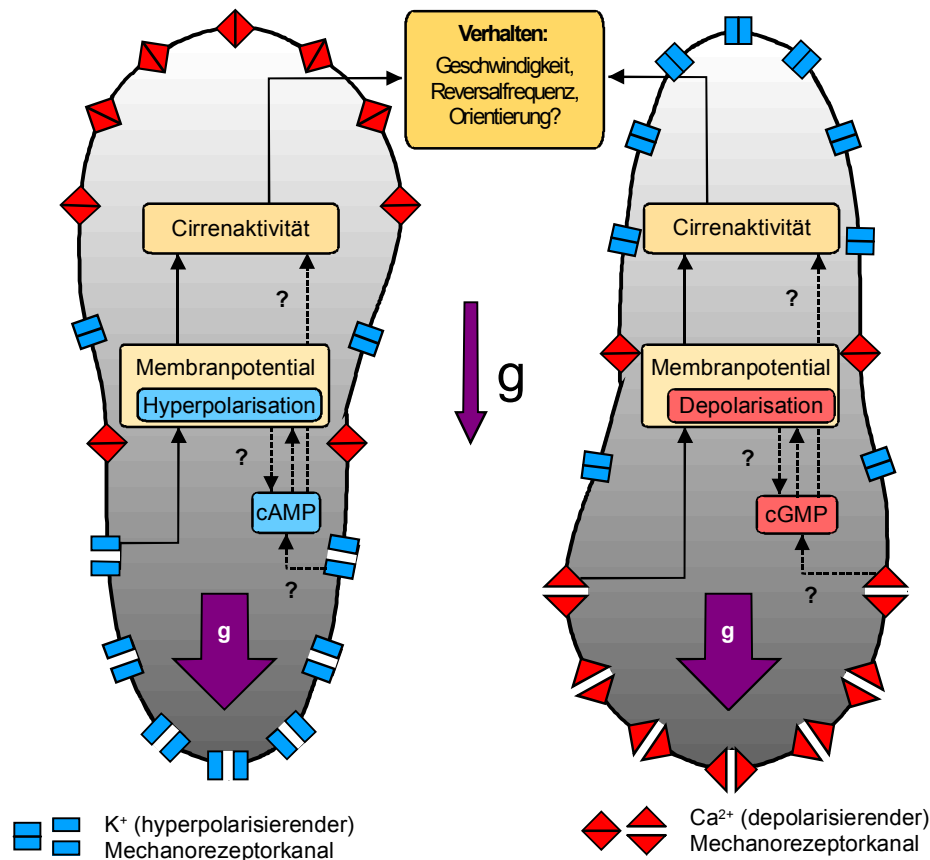


Abb. 1.2: Spezialisierte Statocystenhypothese der Graviperzeption (Machemer et al., 1991) übertragen auf *Stylonychia mytilus*. Eine Aufwärtsorientierung (links) führt zum Öffnen von mechanosensitiven Kaliumkanälen. Die daraus resultierende Hyperpolarisation erhöht über die elektromotorische Kopplung die Cirrenaktivität und dadurch die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Zelle. Bei einer sich abwärts fortbewegenden Zelle (rechts) führt das Öffnen von mechanosensitiven Calciumkanälen und die damit einhergehende Depolarisation zu einer Verlangsamung der Zelle. Eine Beteiligung von sekundären Botenstoffen (cAMP, cGMP) an der Graviperzeption ist nicht abschließend geklärt (Abbildung modifiziert nach Hemmersbach et al., 2002).

Die durch die Schwerkraft hervorgerufene Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit mechanosensitiver Kanäle führt zu einer Modulation der Lokomotionsrate und damit zu einer Gravikinese. Ihr experimenteller Nachweis ergibt sich durch die Messung der Fortbewegungsgeschwindigkeiten und der Sedimentationsgeschwindigkeit. Betrachtet man eine Zelle in einem reizfreien Raum (keine Beein-

flussung der Geschwindigkeit durch äußere Faktoren), so bewegt sie sich in alle Richtungen mit einer konstanten Geschwindigkeit vorwärts. Dieser reizunabhängige Vortrieb der Zelle wird im Folgenden mit P („propulsion“) bezeichnet. Die Geschwindigkeit einer sich bei normaler Erdbeschleunigung aufwärts fortbewegenden Zelle (V_U , „upward“, I.e) ist durch die Wirkung der Sedimentation langsamer als P. Dagegen ist die Geschwindigkeit einer abwärts orientierten Zelle (V_D , „downward“, I.d) durch die Sedimentationsgeschwindigkeit (S) im Vergleich zu P erhöht. Zieht man von V_D die Sedimentationsgeschwindigkeit ab und addiert zu V_U die Sedimentationsgeschwindigkeit hinzu, so deutet eine resultierende Differenz zu P auf das Vorliegen einer Gravikinese hin. Für die richtungsabhängigen Geschwindigkeiten ergibt sich demnach:

$$(I.d) \quad V_D = P + S - \Delta_D$$

$$(I.e) \quad V_U = P - S + \Delta_U$$

Δ_D und Δ_U sind jeweils die Gravikinesen abwärts- und aufwärts sich fortbewegender Zellen. Diese wirken der Sedimentation entgegen (umgekehrte Vorzeichen).

Der schwerkraftunabhängige Vortrieb P einer Zelle kann nur unter bestimmten Versuchsbedingungen (Schwereelosigkeit, Extrapolation aus Hypergravitations-Versuchen auf 0 g) gemessen bzw. abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll für *Stylonychia* der Wert von P bestimmt werden.

Ohne Kenntnis des schwerkraftunabhängigen Vortriebes einer Zelle ist es lediglich möglich, einen generalisierten Gravikinesewert (Δ) für die gesamte Zellpopulation zu bestimmen:

$$(I.f) \quad \Delta = \frac{V_D - V_U}{2} - S$$

Die generalisierte Gravikinese entspricht dem Mittelwert der beiden Teilkinesen (Δ_U, Δ_D).

Der Begriff Gravikinese weicht von der Definition einer Kinese durch andere Autoren ab. Diese bezeichnen die Kinese als eine Geschwindigkeitsmodulation, die nicht abhängig von der Reizrichtung ist (Fraenkel & Gunn, 1940). Ein negatives (positives) Vorzeichen wurde für eine verminderte (verstärkte) Reaktion benutzt, die aus einer erniedrigten (erhöhten) Reizstärke resultiert (Diehn et al., 1977). Die Gravikinese stellt einen Sonderfall dar, da sie sowohl von der Reizstärke als auch von der Reizrichtung abhängt. Eine Gravikinese, welche die Wirkung der Schwerkraft (Sedimentationsgeschwindigkeit) kompensiert, wird (analog zum Begriff „negative Gravitaxis“) als „negative Gravikinese“ bezeichnet (Machemer & Bräucker, 1992). Demgegenüber verstärkt eine positive Gravikinese die Wirkung der Schwerkraft (s. Vorzeichen Gleichung I.f).

Die bisher untersuchten Ciliaten, bei denen eine Gravikinese nachgewiesen wurde, bewegen sich hauptsächlich schwimmend fort. Das Ciliat *Loxodes* gleitet auf Oberflächen. Es ist nicht geklärt, ob die Cilien dabei Kontakt mit dem Substrat haben. Bei *Loxodes* wurde erstmalig ein intrazelluläres Organell, der Müller'sche Körper, für die Schwerkraftwahrnehmung in Betracht gezogen (Fenchel & Finlay, 1986). Das Müller'sche Organell besteht aus einer Vakuole (\varnothing 30 μm), die einen Kristall aus Bariumsulfat enthält. Der kristalline Körper ist mit einem modifizierten Cilium verbunden, das in die Vakuole hineinragt. Es wird vermutet, dass abhängig von der Lage des Kristalls mechanosensitive Kanäle stimuliert werden. Zellen, bei denen der Müllerkörper durch Laserbeschuss entfernt wurde, zeigten keine negative Gravitaxis mehr (Hemmersbach et al., 1997a). Durch Versuche in dichteangepassten Medien konnte gezeigt werden, dass die Gravikinese bei fehlendem Dichteunterschied über der Membran zwar reduziert, aber nicht aufgehoben ist (Neugebauer et al., 1998). Dies würde auf eine unterstützende Wirkung des Müller'schen Organells bei der Graviperzeption hindeuten.

Bei *Stylonychia mytilus* und auch bei anderen auf Schwerkraftwahrnehmung untersuchten Ciliaten lässt sich ein derartiges Organell elektronenmikroskopisch nicht nachweisen.

In dieser Arbeit werden erstmals Experimente zur Schwerkraftwahrnehmung von *Stylonychia* vorgestellt. Dabei handelt es sich um ein Ciliat, das sich vorwiegend auf Oberflächen laufend fortbewegt. Es soll geklärt werden, ob *Stylonychia* eine Graviorientierung und eine Gravikinese ausbildet und ob sich die Schwerkraftwahrnehmung von anderen (schwimmenden) Ciliaten unterscheidet.

1.3. Fragestellung

Im Folgenden werden die einzelnen Fragestellungen dieser Arbeit zusammengefasst:

- Ist *Stylonychia mytilus* in der Lage, die Schwerkraft wahrzunehmen und wenn ja, wie unterscheidet sich die Graviperzeption von der bisher untersuchter Ciliaten?
- Zeigt *Stylonychia mytilus* eine Gravikinese und eine Gravitaxis, um die Wirkung der Schwerkraft zu kompensieren?
- Wie sind die mechanosensitiven Kanäle auf der gesamten Zelloberfläche angeordnet?
- Gilt die spezialisierte Statocystenhypothese auch für *Stylonychia mytilus* und lassen sich lageabhängige Gravirezeptorpotentiale elektrophysiologisch nachweisen?
- Wie verhält sich *Stylonychia mytilus* unter Bedingungen erhöhter und erniedrigter Beschleunigungen?
- Wie ist die Nachwirkung kurzzeitig erhöhter Beschleunigungen auf das Bewegungsverhalten der Zelle?

2. Material und Methoden

2.1. Die Versuchszelle *Stylonychia mytilus*

Als Versuchsobjekt wurden Zellen der Art *Stylonychia mytilus* (Ehrenberg, 1830) verwendet. Wie die meisten hypotrichen Ciliaten besitzt auch *Stylonychia* einen dorso-ventral abgeflachten, asymmetrischen Zellkörper. Die Zellen besitzen auf der ventralen Zellseite mehrere Gruppen von Cirren, von denen am anterioren Zellpol die Frontalcirren und posterior die Transversalcirren besonders kräftig ausgebildet sind. Auf diesen Cirren bewegen sich die Zellen hauptsächlich auf Oberflächen laufend fort. Außer durch Laufen können sich die Zellen auch schwimmend fortbewegen, wobei die Schwimmbahn als eine linksgewundene Helix beschrieben werden kann. *Stylonychia mytilus* besitzt einen zweigeteilten

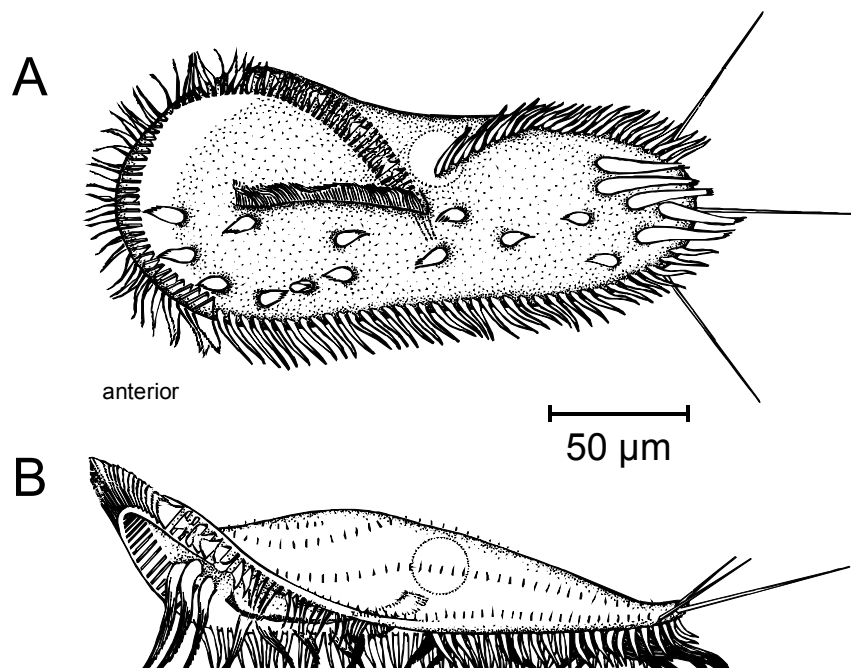


Abb. 2.1: *Stylonychia mytilus* von ventral (A) und lateral (B) betrachtet. Die ventralen Cirrengruppen und die Marginalcirren haben Kontakt mit dem Substrat und ermöglichen es der Zelle auf Oberflächen zu laufen (Abbildung aus Machemer & Deitmer, 1987).

Makronukleus, der sich entlang der Längsachse der Zelle erstreckt. Durch das anterior gelegene Membranellenband wird ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom zum ebenfalls auf der Ventralseite liegenden Peristom gelenkt. Die Mundbucht wird auf ganzer Länge von zwei undulierenden Membranen begrenzt.

Stylonychia mytilus ist ein räuberisches Ciliat, das sich vorwiegend von Bakterien, Algen, kleineren Ciliaten und Flagellaten ernährt (Foissner et al., 1991). Die Vermehrung erfolgt unter optimalen Bedingungen mit einer Teilungsperiode von etwa 20 Stunden (Machemer & Deitmer, 1987). Konjugationen sind möglich. Unter schlechten Bedingungen werden Dauerzysten gebildet. *Stylonychia* bevorzugt in limnischen Biotopen das Benthos stehender oder gering durchströmter Gewässer. Die Verbreitung ist kosmopolitisch (Foissner et al., 1991).

Neben zahlreichen Untersuchungen zur Genetik (Ammermann, 1965), zur Differenzierung des Zellkerns (Ammermann, 1971), zur Morphologie (Shi & Frankel, 1990) und zur Ökologie (Foissner et al., 1991) ist *Stylonychia mytilus* elektrophysiologisch gut charakterisiert (Machemer & Deitmer, 1987). Bisherige Untersuchungen zum Verhalten der Zelle erstrecken sich auf die Untersuchung der komplexen Fortbewegungsweise (Machemer, 1965a; Machemer, 1965b), zur Habituation (Machemer, 1966a) und der Bevorzugung bestimmter Oberflächenstrukturen (Machemer, 1966b).

2.2. Kultivierung

Die in den Versuchen eingesetzten Kulturen von *Stylonychia mytilus* stammen aus dem Labor von Prof. Ammermann (Universität Tübingen). Die Zellen wurden in gepufferter Pringsheim-Lösung (0,08 mM MgSO_4 ; 0,85 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,25 mM KCl) kultiviert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Sörensen-Puffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) auf 7,0 eingestellt. Die Kulturen wurden einmal pro Woche neu angesetzt und je nach Dichte alle zwei bis drei Tage gefüttert. Als Futterorganismus diente der mixotrophe Flagellat *Chlorogonium elongatum* (Chlorophy-

ceae, Volvocales). Die Zellen wurden von der Algenbank Göttingen bezogen, die Kultivierung erfolgte axenisch in *Euglena*-Medium (Anhang, Tab. A.2).

Beide Species waren einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14 zu 10 Stunden ausgesetzt. Die Lichtintensität (Bestrahlungsstärke) während der Hellphase betrug bei der *Stylonychia*-Kultur $3,5 \text{ W/m}^2$ und bei der *Chlorogonium*-Kultur 56 W/m^2 . Die Kultivierungstemperatur wurde auf 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) eingestellt.

2.3. Verhaltensphysiologische Versuchsbedingungen

Um das schwerkraftabhängige Verhalten von Einzellern statistisch zu untersuchen, ist es notwendig, die Fortbewegung der Zellen videotechnisch zu erfassen. Grosse Datenzahlen und die Beobachtung einzelner Zellen über eine ausreichend lange Wegstrecke lassen sich dabei nur erreichen, wenn gewährleistet ist, dass sich viele Zellen in der Fokusebene aufhalten. Daher wurden flache Versuchskammern (2.3.1.) eingesetzt. Die Tiefe der Kammern wurde dabei mit 5 mm so gewählt, dass eine Beeinträchtigung der Bewegung der Ciliaten ausgeschlossen werden konnte (25-fache der Zelllänge).

Durch das Drehen der Versuchskammer konnte erreicht werden, dass sich ein Großteil der Zellpopulation entweder parallel (senkrechte Kammerstellung) oder rechtwinklig (waagerechte Versuchskammer) zum Schwerkraftvektor bewegt. Für die unterschiedlichen Bewegungsformen (Schwimmen, Laufen) wurden die Bewegungsparameter (Richtung, Geschwindigkeit, Reversalrate) computergestützt ausgewertet. Zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen (Flugversuche, Zentrifugenexperimente) musste auf spezielle Hardware zurückgegriffen werden, die im Folgenden beschrieben wird. Um einen möglichen Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Verhalten der Zellen auszuschließen, wurden alle Versuche bei konstanter Temperatur ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) durchgeführt. Alle Versuche wurden, soweit nicht anders beschrieben, in gepufferter Pringsheim-Lösung durchgeführt (Anhang, Tab. A.1).

Von verhaltensphysiologischen Versuchen mit anderen Ciliaten ist bekannt, dass Zellen nach dem Einbringen in die Versuchskammer zunächst für eine bestimmte Zeit inaktiv sind. Es wird vermutet, dass dies auf eine Wechselwirkung zwischen Zellmembran und Kammeroberfläche (Machemer-Röhnisch et al., 1998a) oder auf die Anpassung an eine veränderte ionale Zusammensetzung der Lösung (Oka et al., 1986) zurückzuführen ist. Der Zeitraum zwischen dem Befüllen der Kammer und dem Beginn der Experimente wird im Folgenden als Adaptationszeit bezeichnet.

2.3.1. Versuchskammern

Die in den Versuchsmodule verwendeten Experimentierkammern (Abb. 2.2) sind aus einem Grundkörper aus Acrylglas und einem Metallrahmen mit eingelassener Glasscheibe zusammengesetzt. Die Kammer wird durch einen Ring aus Silikon abgedichtet. Die Tiefe des Schwimmraumes beträgt, wie oben beschrieben, 5 mm. Mit einer Spritze kann die Versuchskammer über die dafür vorgesehenen Zulaufkanülen luftblasenfrei mit Zellsuspension gefüllt werden. Die Kammer wird durch zwei Ventile verschlossen. Pro Versuchsansatz wurden etwa 150 Zellen in 3,5 ml Experimentierlösung in die Kammer eingebracht.

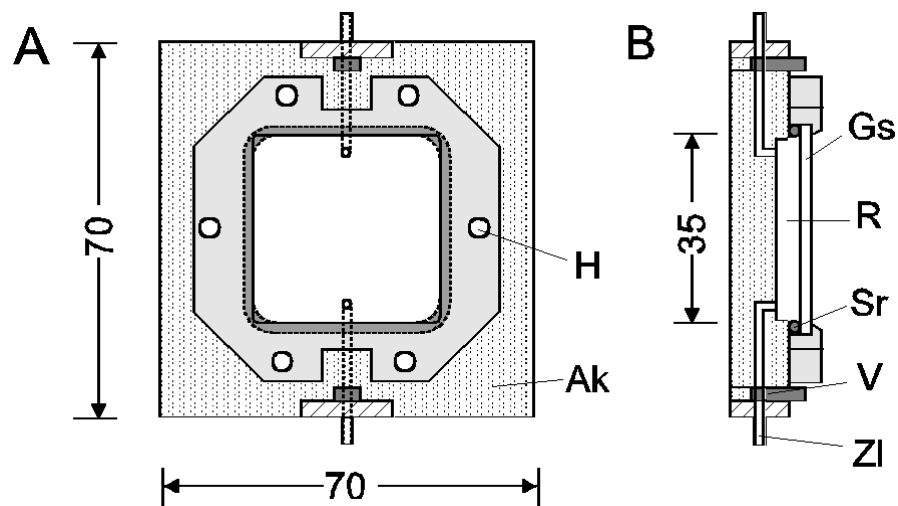


Abb. 2.2: Experimentierkammern für verhaltensphysiologische Versuche in Aufsicht (A) und Querschnitt (B). H: Halteschrauben, R: Schwimmraum, Sr: Silikonring, V: Ventil, Zl: Zulauf, Ak: Acrylkörper, Gs: Glasscheibe. Die Tiefe des Schwimmraumes beträgt 5 mm. Alle Größenangaben in mm (Abbildung modifiziert nach Nagel et al., 1997).

2.3.2. Videoanalyse

Die Videoaufzeichnung der Zellbewegungen erfolgte mit handelsüblichen CCD-Kameras, die mit einer Makro-Optik ausgestattet waren, bei einer Aufnahmerate von 25 Hz (Machemer et al., 1991). Da sich die Versuchszellen vorwiegend laufend fortbewegen, wurde das Videobild auf die Grundfläche des Schwimmraumes fokussiert. Versuchskammer und Videokameras waren so angeordnet, dass die Zellen, die sich mittig auf der Kammergrundfläche aufhielten, aufgenommen wurden. Das Videobild hatte eine Abmessung von $9 \times 7 \text{ mm}^2$, was etwa 5% der Kammergrundfläche entspricht. Durch dieses Verfahren wird gewährleistet, dass die Versuchszellen das Videobild nach allen Seiten hin verlassen können und ein mehrfaches Aufzeichnen der Bewegung derselben Zelle unwahrscheinlicher wird.

Eine Dunkelfeldbeleuchtung wurde durch 48 ringförmig angeordnete Leuchtdioden erzeugt. Die Leuchtdioden emittierten ein Licht der Wellenlänge 565 nm (grün). Durch die Wahl dieses Spektralbereiches sollte eine mögliche Photostimulation der Zellen minimiert werden, denn bei anderen Ciliaten wurde für diesen Wellenlängenbereich eine geringe Lichtempfindlichkeit festgestellt (*Paramecium*: Iwatsuki & Naitoh, 1982). Die Beleuchtungsstärke wurde über die Spannungsversorgung reguliert und betrug bei allen Versuchen etwa 3 W/m^2 .

2.3.3. Einfachapparatur

Für die Durchführung der Vorversuche zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit, der Adaptationsversuche und der Stoßversuche wurde eine Einfachapparatur (Machemer et al., 1991) verwendet. Diese Apparatur besteht im Wesentlichen aus einer Kammerhalterung, einer Beleuchtungseinheit und einer CCD-Videokamera mit Makrolinse (Panasonic, F10). Durch einen Hebel kann die gesamte Apparatur mit der Versuchskammer von der horizontalen in die vertikale Lage gebracht werden. Um Thermokonvektionen innerhalb der Kammer zu verhindern, wurde die Versuchskammer durch Ventilatoren gekühlt.

2.3.4. Fallturm Bremen

Im Fallturm Bremen (Zentrum für angewandte Raumfahrttechnologie und Mikrogravitation, ZARM) besteht die Möglichkeit, Experimente unter erniedrigter Schwerkraft durchzuführen. Dabei wird durch den freien Fall einer Versuchskapsel für 4,75 Sekunden die Erdbeschleunigung auf 10^{-6} g reduziert. Der Übergang von 1 g nach μ g erfolgt stufenförmig. Das Fallrohr hat eine Höhe von 119 m und wird unmittelbar vor einem Flug bis auf einen Restdruck von etwa 14 Pa (± 4 Pa, $N=20$) evakuiert, um so den Effekt der Luftreibung zu minimieren. Das Abbremsen der Versuchskapsel erfolgt in einem mit Polystyrol-Granulat gefüllten Auffangbehälter. Während der Evakuierungsphase können Steuerbefehle über eine Funkstrecke an einen Rechner in der Versuchskapsel übertragen werden. Die Temperatur im Kapselinneren kann bis zum Zeitpunkt des Abwurfs über einen Kühlkreislauf vom Kontrollzentrum reguliert werden. So wird sichergestellt, dass das Verhalten der Zellen nicht durch Temperaturschwankungen nachhaltig beeinflusst wird. Eine der Kontrolle dienende Übertragung der Videobilder aus den Versuchsapparaturen war bis unmittelbar vor dem Abwurf möglich.

2.3.5. Fallturmapparaturen

Für die Verhaltensanalyse von *Stylonychia* unter erniedrigter Schwerkraft wurden zwei Versuchsmodule verwendet (Bräucker, 1994). Die Größe und die elektronische Ausstattung der Module ermöglicht eine Integration in die Versuchskapseln des Bremer Fallturms. In beiden Apparaturen sind jeweils sechs Halterungen für Versuchskammern mit den beschriebenen Beleuchtungseinheiten vorgesehen. Die Aufzeichnung der Zellbewegungen erfolgt mit CCD-Camcordern (Sony, TR360), die mit einer Makrolinsenoptik ausgestattet waren. Durch einen Motor können die Versuchskammern innerhalb einer Minute aus der horizontalen in die vertikale Position gedreht werden. Die Versuchssteuerung erfolgt computergestützt.

2.3.6. Versuche bei reduzierter Schwerkraft

Die mit Zellen gefüllten Versuchskammern wurden etwa 2,5 Stunden vor dem Flug in die Versuchsaapparaturen eingebaut. Anschließend wurde die Kapsel hermetisch verriegelt und an die Spitze der Fallröhre gezogen. Während der zweistündigen Evakuierungsphase betrug die Temperatur in der Kapsel 21°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Eine Stunde vor dem Abwurf wurde die Beleuchtung eingeschaltet. Die Videoaufzeichnung während der Versuche erfolgte nach dem in Abbildung 2.3 dargestellten Zeitplan.

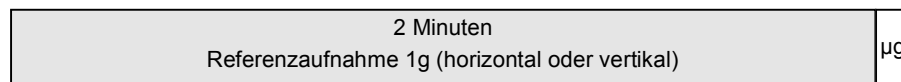


Abb. 2.3: Das Verhalten der Zellen während der μg -Phase konnte für 4,75 Sekunden beobachtet werden. Die Videoaufnahmen endeten mit dem Abbremsen der Fallkapsel. Der Stufenübergang von 1 g zu μg erfolgte innerhalb von 200 ms.

Um den Beginn der μg -Phase für die Videoanalysen zu kennzeichnen, wurde das Aufleuchten einer LED im Videobild mit aufgezeichnet, die zum Zeitpunkt des Abwurfs erlosch. Es wurden 20 Flüge mit insgesamt 180 Versuchskammern durchgeführt, wobei vor dem Abwurf 120 Versuchsansätze vertikal und 60 Versuchsansätze horizontal ausgerichtet waren.

2.3.7. Zentrifuge (CECILIA)

Um die Wirkung eines Reizes auf biologische Systeme zu untersuchen, ist es vorteilhaft, die Reizstärke zu variieren. Im Fall der Schwerkraft kann mit Hilfe von Zentrifugen über einen beliebigen Zeitraum eine erhöhte Beschleunigung erzeugt werden. Aus der Vektoraddition der durch die Drehung hervorgerufenen Zentrifugalbeschleunigung (a_c) und der Erdbeschleunigung (a_g) ergibt sich eine resultierende Beschleunigung (a_r). Der Betrag von a_c (und damit auch von a_r) hängt vom Abstand zur Drehachse und von der Drehgeschwindigkeit der Zentrifuge ab.

Die Versuche bei erhöhter Beschleunigung wurden auf einer an der Ruhr-Universität Bochum gebauten Zentrifuge („CECILIA“, Centrifuge for Ciliates; Bräucker & Machemer, 2002) durchgeführt. Der Antrieb der Zentrifuge erfolgt über einen Gleichstrommotor (Mattke, MC17H), dessen Kraft über Zahnriemen auf die Drehachse übertragen wird. Durch die Wahl unterschiedlicher Betriebsspannungen des Antriebsmotors können in Verbindung mit verschiedenen Untersetzungen resultierende Beschleunigungen im Bereich von 1,01 g - 15 g (a_r) erreicht werden.

Um den Stichprobenumfang der Versuche zu erhöhen, können auf dem horizontalen Drehteller sechs identische Aufnahmeeinheiten montiert werden. Diese bestehen aus jeweils einem CCD-Camcorder mit Makrolinse (Sony, TR 780E), einer Versuchskammerhalterung und einem Leuchtdiodenring. Auf einer zweiten Plattform sind die Elektronik, Akkumulatoren zur Spannungsversorgung und ein Computermodule (BASIC-Briefmarke, Wilke) zur Versuchssteuerung angebracht.

Für unterschiedliche Fragestellungen sind zwei Arten von Kammerhalterungen konzipiert worden:

a) drehbare Kammerhalterung

Diese Kammerhalterung verfügt über zwei Drehachsen. Zu Beginn der Versuche ist die Versuchskammer horizontal, d.h. parallel zum Drehteller, ausgerichtet. Die Kammerhalterung wird durch eine an Achse a (Abb. 2.4 A, B) exzentrisch angebrachte Masse so ausgerichtet, dass der resultierende Beschleunigungsvektor immer senkrecht auf die Kammergrundfläche wirkt. Zu Beginn der Aufnahme wird die Kammer, motorgesteuert, über eine zweite Drehachse (b, Abb. 2.4 C) um 90° gedreht, so dass die Richtung des resultierenden Beschleunigungsvektors parallel zur Kammergrundfläche verläuft. Die optische Achse ist über einen Spiegel auf die Mitte der Kammer ausgerichtet und verläuft in der Höhe der Drehachse a.

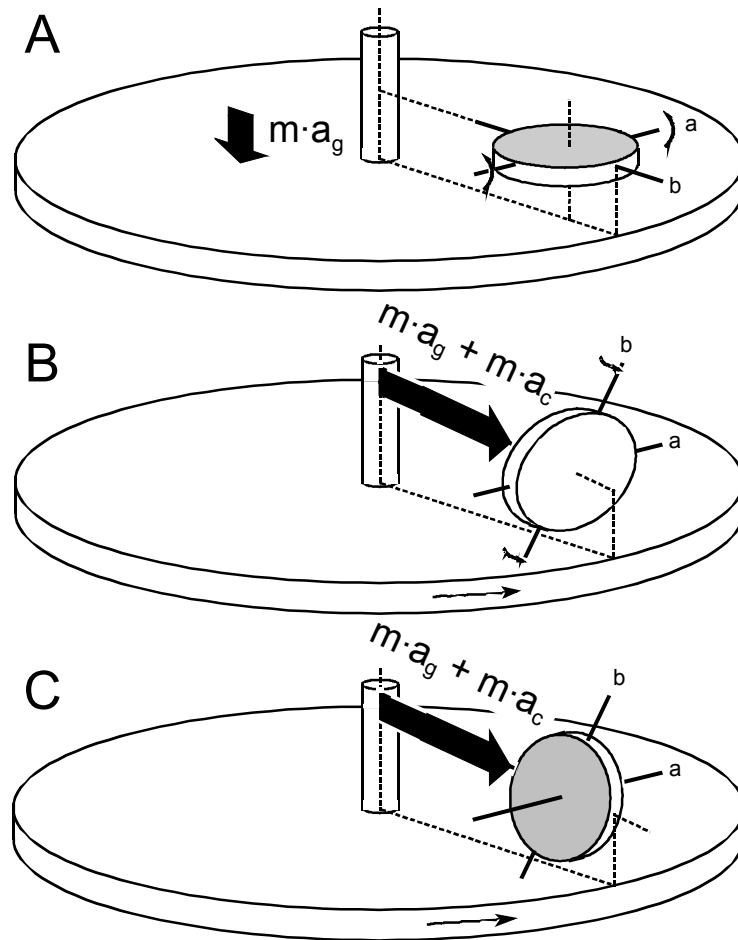


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Drehtellers mit drehbarer Kammerhalterung. Die Drehung der Versuchskammer erfolgt über zwei Achsen (a, b). Bei horizontaler Lage der Kammer (A) kann keine Aufnahme erfolgen. Modifiziert nach Bräucker & Machemer, 2002.

Durch diese Vorgehensweise soll eine Sedimentation bzw. eine zu früh einsetzende schwerkraftinduzierte Orientierungsreaktion der Zellen während der Beschleunigungsphase verhindert werden.

b) statische Kammerhalterung

Diese Kammerhalterung verfügt über keine Drehachse. Die Versuchskammer ist während des gesamten Versuches horizontal (i.e. parallel zum Drehteller) ausge-

richtet. Die optische Achse wird über zwei Spiegel auf die Mitte der Kammer ausgerichtet.

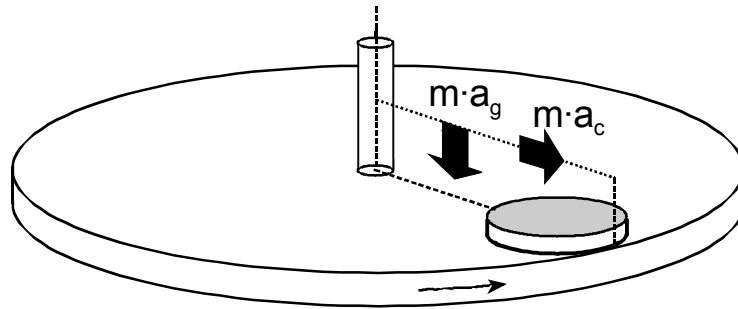


Abb. 2.5: Drehteller mit statischer Kammerhalterung ohne Drehachsen. Die Kammer verbleibt während des Versuches in horizontaler Lage (i.e. parallel zum Drehteller und zum Vektor der Zentrifugalbeschleunigung). Der resultierende Beschleunigungsvektor a_r wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Die Videoaufnahme erfolgt über zwei Umlenkspiegel (nach Bräucker & Machemer, 2002).

Das während der Versuche aufgezeichnete Videobild kann zur Kontrolle über eine Funkübertragungsstrecke auf einem externen Monitor abgebildet werden. Dabei ist durch das Zuschalten eines Multiplexers die zeitlich versetzte Betrachtung aller Versuchskammern möglich.

Die Steuerung der Zentrifuge erfolgt durch zwei Computersysteme. Der Hauptcomputer steuert den zeitlichen Ablauf eines Experimentes und die Drehung der Zentrifuge. Über eine Lichtübertragungsstrecke können Triggersignale auf den Drehteller übertragen werden. Während der Versuche wird die Drehzahl gemessen und über eine Regelstrecke an einen vorgegebenen Sollwert angepasst. Die Änderung der Drehzahl der Zentrifuge folgt einer sigmoidalen Funktion, um eine zu steile Annäherung an den Endbeschleunigungswert zu verhindern. Temperaturwerte werden über zwei Thermistoren gemittelt und zusammen mit den Umdrehungszahlen zeitabhängig zur späteren Kontrolle abgespeichert.

Die vom Hauptcomputer über die optische Übertragungsstrecke ausgesendeten Triggerbefehle rufen die in der „BASIC-Briefmarke“ abgespeicherten Befehlssequenzen auf. Dadurch werden u.a. die Drehung der Versuchskammer und das An- und Abschalten der Dunkelfeldbeleuchtung und der Camcorder gesteuert.

2.3.8. Versuche bei erhöhter Schwerkraft in vertikaler Kammer

Zur Untersuchung der Graviperzeption von *Stylonychia* bei erhöhter Beschleunigung wurden Zentrifugenexperimente mit Versuchskammern in drehbaren Halterungen durchgeführt. Die Adaptationszeit der Zellen an die Versuchskammern betrug drei Stunden. Es wurden pro Versuch fünf g-Stufen im Bereich zwischen 1 g und 4 g pseudorandomisiert ausgewählt. Dabei wurde für jede Beschleunigungsstufe die in Abbildung 2.6 dargestellte Sequenz durchlaufen.

3 Minuten Beschleunigung	KD	3 Minuten Aufnahme	3 Minuten Abbremsen
-----------------------------	----	-----------------------	------------------------

Abb. 2.6: Nach dem Erreichen der Endbeschleunigung wurde die Versuchskammer gedreht (KD, Dauer etwa 1 Minute). Die Dunkelfeldbeleuchtung wurde erst zu Beginn der Videoaufzeichnung eingeschaltet.

2.3.9. Versuche bei erhöhter Schwerkraft in horizontaler Kammer

Aus Experimenten mit anderen Einzellern ist bekannt, dass bei horizontal gestellter Versuchskammer in Abwesenheit anderer Reize keine Orientierung nachgewiesen werden kann (Häder & Lebert, 1985; Machemer & Bräucker, 1992). Horizontal schwimmende Paramecien zeigen auf Grund der bipolaren Verteilung der Mechanorezeptoren bei 1 g keine Gravikinese. Dieses Verhalten ist äquivalent zu den Ergebnissen, die unter μ g-Bedingungen erhoben wurden (Machemer et al., 1992). Es ist zu erwarten, dass sich diese Befunde auch auf *Stylonychia* übertragen lassen, da auch diese Zelle eine bipolare Verteilung von mechanosensitiven Kanälen besitzt. Um dies zu überprüfen, wurden Versuchskammern mit Zellen in die horizontalen, statischen Kammerhalterungen der Zentrifuge (2.3.7. b) einge-

baut. Bei stehender Zentrifuge sollten die Versuchszellen ein Verhalten zeigen, das dem unter Schwerelosigkeitsbedingungen entspricht. Auf die sich horizontal auf der Kammergrundfläche fortbewegenden *Stylonychia*-Zellen sollten im weiteren Versuchsverlauf schwache Zentrifugalbeschleunigungen einwirken. Dazu wurde die Drehzahl der Zentrifuge so eingestellt, dass Zentrifugalbeschleunigungen zwischen 0,1 g und 1 g (a_c) erreicht wurden. Auf diese Weise wurde ein Verhalten induziert, das dem Verhalten in vertikaler Versuchskammer bei Beschleunigungen kleiner als 1 g (a_g , Hypogravitationsbedingungen) entspricht. In Tabelle 2.1 sind die für die verwendeten Zentrifugalbeschleunigungen berechneten resultierenden Beschleunigungswerte (bei $a_g=1$ g) aufgeführt.

Tab. 2.1: Zusammenhang zwischen den verwendeten Zentrifugalbeschleunigungen (a_c) und der resultierenden Beschleunigung (a_r) bei normaler Erdbeschleunigung ($a_g=1$ g).

a_c [g]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
a_r [g]	1,005	1,02	1,04	1,08	1,12	1,17	1,22	1,28	1,35	1,41

Bei der Beurteilung der Wirkung der verschiedenen Beschleunigungen sind folgende Voraussetzungen zu beachten:

- Wirksam für die Graviperzeption sind nur Auswärtsdeformationen der Zellmembran.
- Es können nur die Kräfte zu einer Kanalöffnung führen, die senkrecht auf die Membran wirken.

Auf die Zellmembran und die darin enthaltenen Mechanorezeptoren wirken zwei Kräfte (ma_g , ma_c) ein (Abb. 2.7). Aus der Verrechnung dieser Kräfte und den genannten Voraussetzungen ergibt sich, dass im Vergleich zu normaler Schwerkraft durch die Wirkung von a_c nur ein Teil ($\leq 50\%$) der Mechanorezeptoren aktiviert wird (Bräucker & Machemer, 2002).

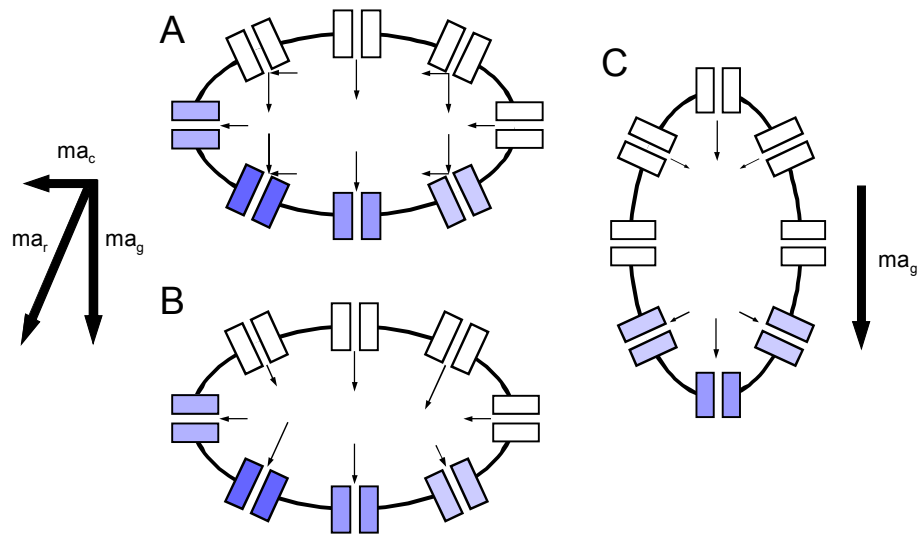


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Aktivierung mechanosensitiver Kanäle. (A): Zentrifugal- und Erdbeschleunigung wirken gleichzeitig auf eine horizontal schwimmende Zelle ein. Nur Auswärtsdeformationen und senkrecht auf die Membranoberfläche wirkende Kräfte führen zur Kanalöffnung (schattiert). (B) Aus Zentrifugal- und Erdbeschleunigung resultierende Kräfte. Durch die bipolare Verteilung der Calcium- und Kalium-Kanäle heben sich depolarisierende und hyperpolarisierende Potentialänderungen teilweise auf (1.2.4.). (C): Bei normaler Erdbeschleunigung senkrecht schwimmende Zelle (Abbildung modifiziert nach Bräucker & Machemer, 2002).

Pro Versuchskammer wurden fünf Beschleunigungsstufen im Bereich 0,1-1,0 g (a_c) pseudorandomisiert ausgewählt. Zwischen dem Einbau der Versuchskammern und dem Beginn der Referenzaufnahme lag eine Ruhephase von fünf Minuten zum Abklingen einer möglichen Mechanostimulation der Zellen. Vor jeder Beschleunigungsstufe wurde eine Referenzaufnahme bei stehender Zentrifuge gemacht. Die Aufnahmezeit betrug 3 Minuten (Abb. 2.8).

3 Minuten Referenzaufnahme 1g	2 Minuten Beschleunigung	3 Minuten Aufnahme	2 Minuten Abbremsen
----------------------------------	-----------------------------	-----------------------	------------------------

Abb. 2.8: Zeitsequenz der Zentrifugenexperimente mit horizontal ausgerichteten Versuchskammern. Die Referenzaufnahme wurde bei stehender Zentrifuge ($a_c=0$) durchgeführt. Die dargestellte Sequenz wurde mit jeder Versuchskammer fünfmal bei verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen wiederholt.

2.3.10. Versuche zur Nachwirkung von erhöhter Schwerkraft

Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu klären, ob eine kurzzeitig erhöhte Beschleunigung das Verhalten der Zellen nachhaltig verändert. Gründe hierfür könnten eine veränderte Reizaufnahme oder Umstrukturierungen des Cytoskeletes sein. Auch in Hinsicht auf weiterführende μg -Experimente ist diese Fragestellung von Bedeutung. Bei Parabelflügen beispielsweise geht der μg -Phase immer eine Phase erhöhter Beschleunigung unmittelbar voraus.

Während der Versuche wurden die Zellen einer Beschleunigung im Bereich zwischen 1 g und 4 g ausgesetzt und das Verhalten der Zellen nach dem Abbremsen der Zentrifuge in regelmäßigen Zeitabständen analysiert (Abb. 2.9). Die Adaptationszeit der Zellen in der Versuchskammer betrug drei Stunden vor Beginn der Experimente. Sofort nach dem Abbremsen der Zentrifuge wurde eine weitere Videoaufnahme durchgeführt und nach 2, 4, 6 und 12 Minuten wiederholt.

KD	2 Minuten Aufnahme	3 Minuten Beschleunigung	2 Minuten Aufnahme	3 Minuten Abbremsen
----	--------------------	--------------------------	--------------------	---------------------

Abb. 2.9: Zeitsequenz der Versuche zur Nachwirkung erhöhter Beschleunigung. Die Versuchskammer wurde zu Beginn der Versuche horizontal eingebaut. Zum Abklingen einer möglichen Mechanostimulation wurden die Versuche erst 10 Minuten nach dem Einbau der Kammer gestartet. Vor der Beschleunigungsphase erfolgte eine Referenzaufnahme bei stehender Zentrifuge. Nach dem Abbremsen der Zentrifuge wurde die Versuchskammer für die weiteren Aufnahmen in vertikaler Ausrichtung belassen (KD = Kammerdrehung nach vertikal).

2.3.11. Datenerfassung

Um die bei der Videoanalyse aufgezeichneten analogen Bildsignale computergestützt auswerten zu können, wurden diese mit einer Videokarte (Meteor, Fa. Matrox) digitalisiert. Das für die Digitalisierung verwendete Programm (ME-DEALAB, K. Vogel) ist in der Lage, auf Grund des Helligkeitsunterschiedes, der Größe und dem Achsenverhältnis Zellen vom Hintergrund zu separieren und in ihrer Fortbewegung zu verfolgen. Dabei werden die Koordinaten der von der Zelle durchlaufenen Bildpunkte (Pixel) in einer Datei abgespeichert. Als Zeitnormal

wird die Systemzeit des Rechners zu Grunde gelegt und parallel mit abgespeichert. Die Kalibrierung der Fortbewegungsstrecke erfolgt durch das Vermessen einer vor jedem Versuch vorgenommenen Aufnahme eines Millimeterpapiers. Da die zeitgleich von MEDEALAB ermittelten Bewegungsdaten Zuordnungsfehler enthalten können, werden sie mit dem Programm FOW-ANA1 (R. Bräucker) überprüft und korrigiert. Das Programm wertet die Zeit- und Koordinatenangaben aus und stellt die Fortbewegungsspuren grafisch dar. Die Auswertung der Spuren kann entweder interaktiv (durch die Auswahl bestimmter Spuren) oder automatisch erfolgen. Dabei werden nur die Spurdaten ausgewählt, die eindeutig auf eine Zelle bezogen werden können. Für die statistische Auswertung werden die Fortbewegungsrichtung und -geschwindigkeit der ausgewählten Zellen abgespeichert.

Im Gegensatz zu einem holotrichen Ciliaten (z.B. *Paramecium*) sind, auf Grund der asymmetrischen Verteilung der Cirren, die Bewegungsspuren von *Stylonychia* nicht geradlinig, sondern gekrümmt. Eine derartige Krümmung würde jedoch die Zuordnung einer Zelle zu bestimmten Winkelsektoren erschweren bzw. verfälschen. Um dies zu verhindern, wurde bei der Auswertung darauf geachtet, dass nur geradlinige Spurabschnitte hinreichender Länge ($> 1500 \mu\text{m}$) vermessen wurden.

Mit dem Programm FOW-ANA1 ist es zusätzlich möglich festzustellen, ob und wie oft eine Zelle ein Reversal macht. Die Anzahl der Reversal wird für jede Zelle mit den zugehörigen Zeitdaten abgespeichert. Mit dem Programm REVCOUNT (R. Bräucker) werden die Daten ausgewertet. Dabei wird nach Gleichung II.a die mittlere Reversalrate (f_R) pro Zelle und Minute bestimmt (N_R = individuelles Reversal-Ereignis, Z = Gesamtzahl aller ausgewerteten Schwimmspuren, t_{Spur} = mittlere Beobachtungszeit für eine Schwimmspur).

$$(II.a) \quad f_R = \frac{\sum N_R}{Z \cdot t_{\text{Spur}}}$$

Die Aktivität einer Zellpopulation kann erfasst werden, indem man in zeitlich definiertem Abstand zwei Bilder einer Versuchskammer aufzeichnet. Das Programm MOTIL-ANA (R. Bräucker) kann auf Grund des Helligkeitsunterschiedes und der Fläche in einem Videobild Zellen erkennen und deren Anzahl bestimmen. Nach einer Überlagerung der beiden Einzelbilder erfasst das Programm die Zahl der Zellen, deren Position sich nicht verändert hat (inaktive Zellen). Die Gesamtzahl ist der gerundete Mittelwert aus beiden Aufnahmen. Die Anzahl der aktiven Zellen ergibt sich aus der Differenz der Gesamtzahl und der Zahl der inaktiven Zellen und wird als relativer Anteil angegeben.

2.3.12. Immobilisierung

Für die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit (S) ist es notwendig, die zur Fortbewegung der Zellen dienende Cilienschlagbewegung anzuhalten bzw. zu unterbinden. Durch die Immobilisierung darf dabei weder die Form der Zellen (osmotische Wirkung, Veränderungen im Cytoskelett) noch die Viskosität des Mediums beeinflusst werden, da beides zu einer Verfälschung der Sedimentationsgeschwindigkeit führen würde. Für die Anwendung an lebenden Zellen wurde die Deciliierung mit Ethanol (Ogura, 1981) oder die Behandlung mit Schwermetallionen etabliert. Über Nickelionen ist bekannt, dass sie bevorzugt an die 14S-Dyneinuntereinheit des Axonems binden und so den mikrotubulären Gleitmechanismus in den Cilien hemmen (Larsen & Satir, 1991).

Stylonychia-Zellen wurden in Pringsheim-Lösung gewaschen. In einer Petrischale wurden 0,4 ml der Zellsuspension mit 19,6 ml einer 0,1 M Nickelchloridlösung zu einer Endkonzentration von 2 mM Ni^{2+} vermischt (Anhang, Tab. A.1). Die Zellen wurden sofort nach der Immobilisierung in die Versuchskammer gefüllt. Die Zeit zwischen dem Einbringen der Zellen in die Nickelchloridlösung und der ersten Aufnahme betrug etwa 10 Minuten. Die Kontrolle der Zellform wurde mikroskopisch durchgeführt.

Die ersten Aufzeichnungen der Sedimentationsgeschwindigkeit von *Stylonychia* erfolgten in der Einfachapparatur (2.4.3.). Die Versuchskammer wurde senkrecht in die Apparatur eingebaut. Nachdem ein Großteil der Zellen das Videobild passiert hatten, wurde die Versuchskammer ausgebaut, um 180° gedreht und wieder eingebaut. Dieser Vorgang wurde mit jeder Kammer maximal viermal wiederholt.

Für die Bestimmung der beschleunigungsabhängigen Sedimentationsgeschwindigkeiten wurde jede Versuchskammer drei verschiedenen Beschleunigungen im Bereich von 1 g bis 2 g ausgesetzt (CECILIA, 2.4.7.). Die Auswahl der g-Stufen erfolgte pseudorandomisiert. Nach einer Beschleunigungsphase von zwei Minuten bis zur jeweiligen g-Stufe wurde die Sedimentation der Zellen über einen Zeitraum von zwei Minuten aufgezeichnet. Nach dem Abbremsen der Zentrifuge wurden die Zellen vor der folgenden Aufnahme durch vorsichtiges Drehen der Versuchskammer resuspendiert.

2.3.13. Adaptationsversuche

Um die optimale Adaptationszeit von *Stylonychia* zu ermitteln, wurden Versuchsreihen mit Zellen in unterschiedlichen Experimentierlösungen durchgeführt. Es wurden jeweils drei Kammern mit 1-1-1 Lösung, drei Kammern mit gepufferter Pringsheim-Lösung und zur Kontrolle drei Kammern mit Kulturlösung gefüllt (Anhang, Tab. A.1). Die ersten Videoaufzeichnungen erfolgten direkt nach dem Befüllen der Kammern und wurden nach 1½, 4, 6, 8, 24, 30 und 52 Stunden wiederholt. Bei jeder Aufnahme wurde die in Abbildung 2.10 dargestellte Sequenz durchlaufen.

2 Minuten Ruhephase	2 Minuten ~ Aufnahme	2 Minuten Drehung	2 Minuten ^ Aufnahme
------------------------	-------------------------	----------------------	-------------------------

Abb. 2.10: Zeitsequenz der Adaptationsversuche, die Dunkelphasen sind grau dargestellt. Die Drehung der Versuchskammer von der horizontalen (~) in die vertikale (^) Kammerposition dauerte zwei Minuten. Ruhephasen dienten dem Abklingen einer möglichen Mechanostimulation.

Es wurden die Lokomotionsrate bei horizontaler Versuchskammer, die Gravikinese, die Orientierung und die Aktivität der Zellen ausgewertet.

2.3.14. Stoßversuche

Das Verhalten von Zellen in einer Versuchskammer kann abhängig vom Versuchsdesign durch mechanische Erschütterungen (Vibration beim Drehen der Versuchskammer, Stoßerschütterungen, lineare Beschleunigungen) beeinflusst werden. Die dabei gleichzeitig aktivierten Populationen von Mechanorezeptoren in der Zellmembran tragen unterschiedlich stark zur Änderung des Membranpotentials bei. Die daraus resultierende Verhaltensantwort hängt in erster Linie davon ab, ob sich die mechanische Erregung zu einer De- oder einer Hyperpolarisation summiert. Um genauere Aussagen über die mechanische Erregbarkeit von *Stylonychia* machen zu können, wurde das Verhalten nach einer stoßartigen Bewegung des Flüssigkeitsvolumens der Versuchskammer analysiert. Dazu wurden zwei Silikon-Schläuche (5 mm Durchmesser) an die geöffneten Einlassventile der Versuchskammern angeschlossen und luftblasenfrei mit Pringsheim-Lösung gefüllt. Durch ein computergesteuertes Magnetventil wurde einer der Schläuche innerhalb von 200 ms komprimiert, was zu einer Flüssigkeitsverschiebung von 0,25 ml in der Versuchskammer führte. Die Dokumentation des Zeitpunktes des mechanischen Reizes erfolgte durch das Aufleuchten einer LED im Videobild. Die Reizsituation wurde dadurch variiert, dass die Kompression des Schlauches zwei- oder dreimal mit einem Abstand von 200 ms wiederholt wurde.

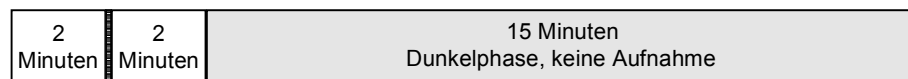


Abb. 2.11: Zeitlicher Versuchsablauf der Stoßversuche. Zwischen den beiden zweiminütigen Aufnahmephasen erfolgte die Reizung der Zellen (schwarzer Balken). Zum Abklingen der mechanischen Stimulation wurde zwischen zwei Versuchsabschnitten eine 15-minütige Ruhephase eingelegt. Alle Versuche wurden bei horizontal gestellter Kammer durchgeführt.

Das in Abbildung 2.11 dargestellte Versuchsmuster wurde pro Versuchsansatz mit dem einfachen Reiz dreimal, mit dem zweifachen Reiz zweimal und mit dem dreifachen Reiz einmal durchgeführt. Es wurden fünf Versuchsansätze in horizontaler Kammerposition und fünf Versuchsansätze in vertikaler Kammerposition vermessen. Die Zellen wurden drei Stunden vor Versuchsbeginn in die Kammern gefüllt.

Ausgewertet wurde die Veränderung der Fortbewegungsgeschwindigkeiten horizontal laufender Zellen.

2.4. Elektrophysiologische Versuchsbedingungen

Die elektrophysiologischen Versuche an *Stylonychia mytilus* wurden nach der Methode von Naitoh und Eckert (1972) durchgeführt. Dabei erfolgt die Messung des Membranpotentials differentiell über eine intra- und eine extrazelluläre Elektrode (V_i , V_a). Über eine zweite intrazelluläre Elektrode können Konstantstrompulse in die Zelle injiziert werden. Mit dem verwendeten elektrophysiologischen Aufbau ist es möglich, sowohl eine Veränderungen des Membranpotentials ($V_m = V_i - V_a$) nach elektrischer oder mechanischer Reizung der Zelle als auch Transmembranströme bei kontrollierter Verschiebung des Membranpotentials (Spannungsklemme) zu messen.

2.4.1. Elektrophysiologischer Messplatz

Die elektrophysiologischen Versuche wurden unter mikroskopischer Kontrolle bei 400-facher Vergrößerung (Wasserimmersion) durchgeführt. Auf dem Kreutztisch des Mikroskops (Fa. Zeiss) war eine Kühlvorrichtung befestigt, in deren Mitte eine nach oben offene Versuchskammer (Bad, Abb. 2.12) eingelassen war. Die Kammer bestand aus einem Plexiglasrahmen und einer auf der Unterseite angebrachten Glasscheibe. Das Bad wurde während des Versuches zentral von einem Deckglasstreifen (15 mm x 4 mm) überbrückt. Diese Glasbrücke wurde durch einen Metallstreifen beschwert, in dessen Mitte sich eine Bohrung von 2 mm

Durchmesser befand. Durch diese Öffnung verlief bei korrekt positioniertem Kreutztisch die optische Achse des Mikroskops. Die Versuchszelle befand sich während der Experimente auf der Unterseite der Brücke. Da das Mikroskop nicht mit einer inversen Optik ausgestattet war, mussten die Elektroden von unten an die Zelle herangeführt werden.

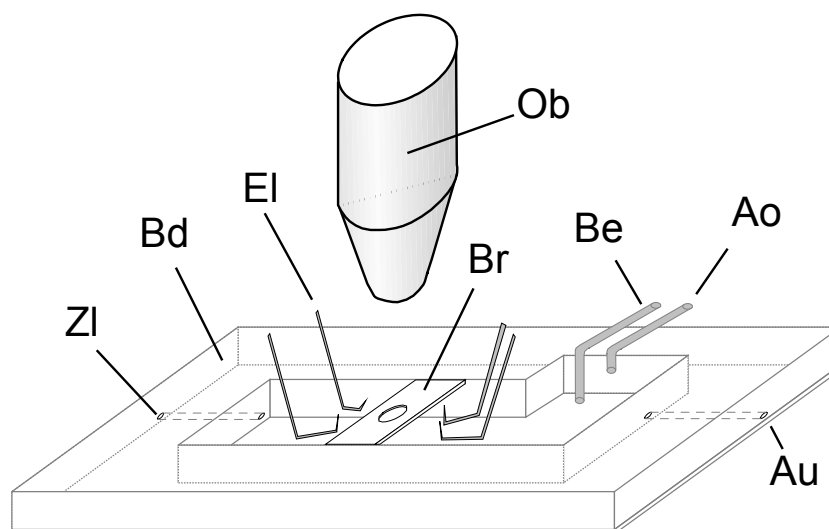


Abb. 2.12: Schematische Darstellung der elektrophysiologischen Versuchszelle (Bd). Das Bad wird über den Zulauf (Zl) mit Experimentierlösung gefüllt (Br: Brücke, El: Elektroden, Ob: Objektiv, Be: Badelektrode, Ao: obere Absaugung, Au: untere Absaugung).

Die in den Versuchen benutzten Elektroden wurden aus Borosilikat-Kapillaren mit Filament (\varnothing 1 mm, Hilgenberg) hergestellt. Dazu wurden die Glaskapillaren auf einem horizontalen Ziehgerät (PN-3, Fa. Narishige Scientific Instrument Laboratory Ltd., Tokyo) spitz ausgezogen und anschließend zweifach abgewinkelt (je etwa 30°). Die Füllung der Elektroden mit kochendem Elektrolyten (1 M KCl) erfolgte bei Unterdruck. Die so hergestellten Elektroden hatten einen Widerstand zwischen $40\text{ M}\Omega$ (Stromelektroden) und $100\text{ M}\Omega$ (intra- und extrazelluläre Spannungselektrode). Der Spitzendurchmesser derartiger Elektroden liegt unterhalb von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ (Machemer, 1975). Während des Versuches wurden die Elektroden mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Leitz) positioniert. Die Spannungselektroden

wurden über elektrolytgefüllte Elektrodenhalter an Impedanzwandler (Eingangsimpedanz $10^{12} \Omega$) mit manueller Kapazitätskompensation angeschlossen. Über einen Subtraktor ($V_i - V_a$) konnte das Membranpotential auf einem Oszilloskop (R5111, Fa. Tektronix) dargestellt werden.

Die Stromelektrode wurde über ihren Elektrodenhalter an eine Konstantstromquelle angeschlossen. Für die Versuche in der Spannungsklemme wurde das Membranpotential über einen Leistungs-Differenzverstärker (171K, Analog Devices) mit einem vorgegebenen Potential (Haltepotential) verglichen. Bei einer Abweichung wurde Strom über die Stromelektrode in die Zelle injiziert, um so die Zelle auf dem vorgegebenen Membranpotential zu halten. Die Transmembranströme wurden über eine Badelektrode gemessen. Diese bestand aus einer einfach gebogenen Glaskapillare (\varnothing 1 mm), die mit Agar (1% in 1 M KCl-Lösung) gefüllt war. Im Inneren der Badelektrode und der Elektrodenhalter befand sich, neben dem Elektrolyten, ein Silberdraht. Um eine Polarisierung der Elektroden zu vermindern, wurde dieser Draht mit einer Schmelze aus Silberchlorid (AgCl) überzogen. Die aus dem Elektronenübergang zwischen Elektrolyt und Metall entstehenden Potentialschwankungen wurden vor dem Versuch manuell abgeglichen.

2.4.2. Versuchsvorbereitung

Die Zellen wurden zwei Stunden vor Versuchsbeginn an die Experimentierlösung (1 mM CaCl_2 , 1 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 7,0) adaptiert. Unmittelbar vor dem Versuch wurde eine Zelle in einem Tropfen Experimentierlösung auf die Unterseite der Deckglasbrücke aufgetragen. Die Glasbrücke wurde bei bereits positionierten Elektroden über die Versuchskammer gelegt. Um eine Fortbewegung während des Versuches zu verhindern, wurde die Zelle zunächst mit einer Haltekapillare räumlich fixiert. Die Kapillare wurde von der Ventralseite aus in die Zelle gestochen, um einen Kontakt der Cirren mit dem Deckglastreifen und damit einem Fortlaufen der Zellen während des Experimentes entgegenzuwirken.

Bei einigen Versuchen wurde zusätzlich die extrazelluläre Spannungselektrode durch die Zelle durchgestochen und damit verhindert, dass sich die Zelle von der Haltekapillare losriss. Anschließend wurde das Bad über einen Zulauf mit Experimentierlösung geflutet. Die intrazelluläre Spannungselektrode und die Stromelektroden wurden in jeweils einen der beiden Teile des Makronukleus eingestochen. Zu Beginn eines jeden Versuches wurde durch die Injektion kleiner hyperpolarisierender Konstantstimpulse der Eingangswiderstand der Zelle bestimmt. Alle Versuche fanden bei einer Temperatur von 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) statt.

2.4.3. Auswertung

Die elektrophysiologischen Messdaten wurden über einen Rechner mit Analog-Digital-Wandlerkarte (4 Kanäle, Boskop, Eigenbau Universität Bochum) abgespeichert. Die Filterung und Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm BEDAT (V. Weber, M. Stuke). Es wurden nur Daten von Zellen ausgewertet, deren Eingangswiderstand mindestens 10 M Ω betrug. Die von einer individuellen Zelle gewonnenen Messwerte werden im Folgenden als "Versuch" bezeichnet.

2.4.4. Konstantstrominjektion

Zur Bestimmung der passiven Membraneigenschaften von *Stylonychia* (Eingangswiderstand, Zeitkonstante) wurden negative und positive Konstantstimpulse mit einer Amplitude von -6 nA bis $+6\text{ nA}$ in die Zelle injiziert. Die Pulsdauer betrug jeweils 80 ms. Es wurden jeweils die transienten, maximalen Änderungen des Membranpotentials ausgewertet, sowie die späten („steady-state“) Änderungen des Membranpotentials kurz vor Pulsende.

2.4.5. Spannungsklemme

Bei den Versuchen in der Spannungsklemme wurde das Membranpotential der Zellen auf das jeweilige Ruhepotential eingestellt, so dass kein Nettostrom über

der Membran messbar war. Ausgehend von diesem Haltepotential wurde die Zelle durch Spannungsstufen mit Amplituden von -70 mV bis $+90$ mV gereizt (Stufenklemme). Die Pulsdauer betrug jeweils 80 ms. Ausgewertet wurden die transienten, maximalen Änderungen des Transmembranstromes sowie die „steady-state“ Änderungen kurz vor Pulsende. Unter Berücksichtigung des Ruheeingangswiderstandes der jeweiligen Versuchszelle konnte der Stromanteil berechnet werden, der für die Aufrechterhaltung der Stufenspannung notwendig ist. Während der Auswertung wurden die erhobenen Daten um diesen Stromanteil korrigiert (Leckstromkorrektur).

2.4.6. Mechanostimulation

Die Untersuchung der Mechanosensitivität von *Stylonychia* wurde nach der von de Peyer & Machemer (1978) beschriebenen Methode durchgeführt: Zu Beginn des Versuches wurden die Membraneigenschaften der Versuchszelle, wie in 2.4.2. beschrieben, gemessen. Anschließend wurden mehrere Stellen der Zellmembran mechanisch gereizt. Als Stimulator wurde ein aus zwei Teilen zusammengesetzter Glas-Stylus verwendet. Der distale Teil wurde spitz ausgezogen (Durchmesser < 1 μ m), mehrfach abgewinkelt und konnte bei Bedarf ausgewechselt werden. Der basale Teil wurde am piezoelektrischen Tonkopf eines Audio-Tonabnehmersystems (Philips) befestigt. An die zwei Piezokristalle des Tonkopfes wurden mit Hilfe eines Pulsgenerators (PG 505, Tektronix) Spannungspulse angelegt.

Als Pulsform wurde ein trapezförmiger Verlauf gewählt. Durch eine schnelle Anstiegszeit (2 ms) erfolgte eine schnelle Beschleunigung des Stimulators mit einer anschließenden Phase konstanter Geschwindigkeit. Während der Plateauphase von 5 ms erfolgt der Kontakt des Stimulators mit der Membran. Durch eine relativ lange Abfallzeit des Pulses (10 ms) konnte gewährleistet werden, dass sich der Stimulator ausreichend schnell von der Membran entfernt und die Phase des Nachschwingens gering gehalten wurde (de Peyer & Machemer, 1978). Die Tot-

zeit zwischen Pulsbeginn und Beginn der Auslenkung des Stimulators einer derartigen Reizapparatur liegt bei etwas 2 ms (Nagel, 1998).

Über einen Joystick konnte die Auslenkungsrichtung des Stimulators bestimmt werden, indem die beiden Piezokristalle durch den Pulsgenerator über zwei Potentiometer unterschiedlich stark angesteuert wurden.

Die Reizung der Zelle erfolgte durch den Kontakt des Stimulators mit der Zellmembran. Dabei ist die Auslenkungsstrecke des Stimulators ein relatives Maß für die Kraft, mit der die Zellmembran nach innen gedrückt wird. Die Auslenkungsstrecke wurde durch die Amplitude der angelegten Spannung bestimmt und konnte mit Hilfe eines Okularmikrometers kalibriert werden. Dazu wurden repetitive Spannungspulse mit einer Frequenz oberhalb der Verschmelzungsfrequenz des menschlichen Auges an die Piezokristalle angelegt. Die Spitze des Stimulators bildet sich dann im mikroskopischen Bild als Linie ab und konnte vermessen werden.

Für die Versuche wurde die Pulsspannung so eingestellt, dass die Auslenkungsstrecke des Stimulators 10 μm betrug. Die Spitze des Stimulators wurde etwa 2 μm von der Zellmembran entfernt positioniert. Dies war notwendig, um eine Mehrfachreizung der Zellen durch ein unvermeidliches, geringfügiges Nachschwingen der Reiznadel zu verhindern. Die Netto-Auslenkungsstrecke (Eindrücken der Zellmembran) betrug daher 8 μm .

Je nachdem, ob die Zelle an der lateralen Membran oder an der ventralen bzw. dorsalen Membranseite gereizt werden sollte, wurde die Spitze des Stimulators vertikal oder horizontal, i.e. parallel zum Boden des Bades, ausgerichtet. Bei horizontal ausgerichteter Reiznadel konnte der Abstand über den zuvor kalibrierten Feintrieb des Mikroskops annähernd bestimmt werden. Jede Versuchszelle wurde an den gleichen Stellen der Membran gereizt. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Reizungen betrug etwa 30 Sekunden. Ausgewertet wurden, in Abhängigkeit

vom Ort des Reizes, die Änderungen des Membranpotentials oder, bei Versuchen unter Spannungsklemme, die Transmembranströme.

2.4.7. Ableitung von Gravirezeptorpotentialen

Für die elektrophysiologische Ableitung von Gravirezeptorpotentialen wurden die intrazelluläre Spannungselektrode und die Stromelektrode einfach gebogen, so dass die Elektrodenspitze parallel zum Boden der Versuchskammer ausgerichtet war (Abb. 2.13). Die Zelle wurde zu Versuchsbeginn mit zwei Haltenadeln fixiert und durch Absenken von der Brücke entfernt.

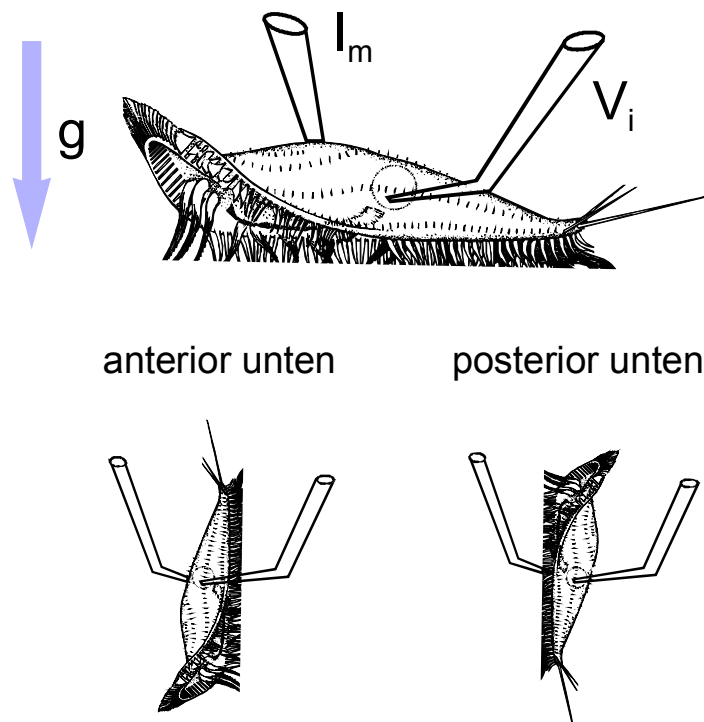


Abb. 2.13: Messung von Gravirezeptorpotentialen. Die intrazelluläre Spannungselektrode und die Stromelektrode werden in der Zellmitte von lateral aus in die Zelle eingestochen. Die Zelle kann so gedreht werden, dass entweder der anteriore oder der posteriore Zellpol abwärtsgerichtet ist. Die zu messende Potentialänderung (Gravirezeptorpotential) wird durch den Druck des Cytoplasmas auf die jeweils unten liegende Membran und die darin enthaltenen mechanosensitiven Ionenkanäle induziert (I_m : Stromelektrode, V_i : intrazelluläre Spannungselektrode).

Die beiden horizontalen Elektroden wurden lateral in Höhe des posterioren Makronukleus in die Zelle eingestochen. Nach dem Abklingen der durch das Einstechen herbeigeführten mechanischen Reizung wurde eine Messung des Membranpotentials durchgeführt. Die Messung erstreckte sich über eine Gesamtdauer von maximal 120 Sekunden. Etwa 30 Sekunden nach dem Beginn der Messung wurde die Zelle gedreht. Dabei wurde die Zelle mit Hilfe der Mikromanipulatoren so orientiert, dass entweder der anteriore oder der posteriore Zellpol in Richtung des Schwerkraftvektors ausgerichtet war. Der Zeitraum der Drehung wurde durch die Aufnahme eines Triggersignals gekennzeichnet.

2.5. Größenvermessung

Die elektrischen Eigenschaften einer Zelle sind u.a. abhängig von der Membranoberfläche und damit von der Größe der Zelle. Darüber hinaus ist die Kenntnis von Zellvolumen und -oberfläche zur Berechnung der nach der Statocystenhypothese wirksamen Kräfte bei der Graviperzeption erforderlich. Aus diesen Gründen wurden Einzelbilder von Zellen bei 150-facher Vergrößerung aufgenommen und digitalisiert. Mit dem Programm „Zellfläch1“ (R. Bräucker) wurden die Längs- und Querachsen der Zellkörper vermessen und statistisch ausgewertet. Die Kalibrierung erfolgte durch die Aufnahme und Vermessung eines mm-Papiers. Die Genauigkeit der Messung betrug bei der verwendeten Vergrößerung 3,6 μm . Zwei Messreihen wurden mit Zellen aus Kulturen durchgeführt, die zwei bzw. drei Tage nicht gefüttert worden waren. Um ein mehrmaliges Vermessen der selben Zellen zu verhindern, wurden die Zellen in der Versuchskammer einmal pro Minute resuspendiert und die Dauer der Aufnahmen auf je 15 Minuten begrenzt.

2.6. Statistik

Da aus früheren Versuchen bekannt ist, dass weder bei den verhaltensphysiologischen noch den elektrophysiologischen Messungen von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden kann, wurden für die Auswertung Methoden der

nichtparametrischen Statistik angewendet (Median, 95%-Konfidenzbereiche, U-Test). Zur Erhöhung des Stichprobenumfangs wurden in der Regel Daten, die unter vergleichbaren Bedingungen erhoben wurden, zusammengefasst. Mit dem U-Test nach Mann-Whitney (zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit 5%) wurde geprüft, ob unabhängige Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen (Sachs, 1984).

Für die Analyse der richtungsabhängigen Fortbewegungsgeschwindigkeiten wurden die Spurdaten in Winkelklassen eingeteilt (Abb. 2.14). In den meisten Fällen wurden 90°-Sektoren gewählt. Als Spuren von sich aufwärts fortbewegenden Zellen gelten demnach solche, deren Winkel zwischen 315° und 45° liegen. Abwärts laufende Zellen hatten einen Spurwinkel zwischen 135° und 225°. Von den Fortbewegungsgeschwindigkeiten der einzelnen Winkelklassen wurden die Mediane berechnet. Unterschiede zwischen den Medianen wurden mit dem U-Test auf Signifikanz geprüft.

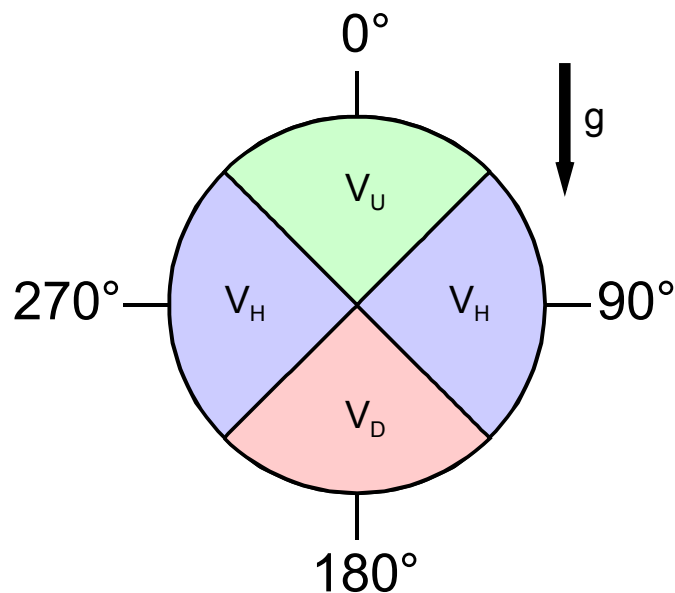


Abb. 2.14: Darstellung der 90°-Sektoren für die Bestimmung der richtungsabhängigen Fortbewegungsgeschwindigkeiten (V_U : Aufwärtslaufgeschwindigkeit, V_D : Abwärtslaufgeschwindigkeit, V_H : Laufgeschwindigkeit horizontal ausgerichteter Zellen).

Um die berechneten Werte für die gravikinetische Komponente Δ statistisch abzusichern, wurde folgendermaßen vorgegangen. Die mediane Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellpopulation wurde zu allen individuellen, gemessenen Aufwärtslaufgeschwindigkeiten addiert ($V_{Ui} + S$) und von allen Abwärtslaufgeschwindigkeiten subtrahiert ($V_{Di} - S$). Wenn danach noch mit Hilfe des U-Test ein Unterschied zwischen den modifizierten Datensätzen nachgewiesen werden kann, kann dieser nicht mehr auf die Wirkung der Sedimentation, sondern nur noch auf eine aktive, richtungsabhängige Geschwindigkeitsmodulation, d.h. eine Gravikinese, zurückgeführt werden (Machemer et al., 1991).

Zur Bewertung der Orientierung einer Zellpopulation in Bezug auf einen bestimmten Reiz (Taxis), wurden die Methoden der zirkulären Statistik angewendet (Batschelet, 1981). Der arithmetische Mittelwert der (individuellen) Fortbewegungsrichtungen β_i ist kein adäquates Maß zur Beschreibung von Orientierungen. Richtiger ist es, die Häufigkeit einzelner Winkeldaten als Vektoren im Einheitskreis darzustellen. Diese Vektoren verbinden den Mittelpunkt des Kreises mit den Koordinaten $x_i (= \cos \beta_i)$ und $y_i (= \sin \beta_i)$. Aus der Summe aller Koordinaten und der Datenzahl n lassen sich die Koordinaten eines mittleren Orientierungsvektors berechnen.

$$(II.b) \quad \bar{x} = \frac{\sum (\cos \beta_i)}{n}$$

$$(II.c) \quad \bar{y} = \frac{\sum (\sin \beta_i)}{n}$$

Der mittlere Vektor wird im kartesischen Koordinatensystem durch den Punkt (\bar{x}, \bar{y}) , im Polarkoordinatensystem durch den mittleren Winkel Φ und dem Radius r definiert. (Er stellt gleichzeitig den Schwerpunkt des polaren Richtungs-Häufigkeitsdiagramms [„Polarhistogramms“] dar.)

$$(II.d) \quad r = \sqrt{\frac{-2}{x} + \frac{-2}{y}}$$

Der r-Wert kann Werte zwischen 0 und +1 annehmen und ist ein Maß für die Gerichtetheit einer Population (unabhängig von der Richtung eines Reizes).

Im Fall der Gravitaxis kann die Präzision der Orientierung jedoch besser mit dem Orientierungskoeffizienten r_0 beschrieben werden. Er ergibt sich aus dem Produkt des r-Wertes und dem Kosinus des mittleren Orientierungswinkels Φ und berücksichtigt, in Bezug auf die in Abbildung 2.14 dargestellte Winkeldefinition, die Richtung des Schwerkraftvektors und damit die Richtung des betrachteten Reizes (Machemer et al., 1991).

$$(II.e) \quad r_0 = r \cdot \cos \Phi$$

r_0 nimmt einen Wert von +1 an, wenn alle Zellen entgegen dem Schwerkraftvektor und einen Wert von -1, wenn alle Zellen in Richtung des Schwerkraftvektors orientiert sind. Ein r_0 -Wert von 0 kann unter verschiedenen Bedingungen auftreten:

- Die Population ist stochastisch, d.h. in alle Richtungen gleichmäßig verteilt.
- Die Zellen sind gleichermaßen aufwärts wie abwärts, entlang der 0°-180° Achse, verteilt ("neutral gravitaxis" bei *Loxodes* (Machmer-Röhnisch et al., 1993)).
- Alle Zellen sind in Richtung 90° oder 270° orientiert (dieser theoretische Fall wurde bei Ciliaten nie beobachtet).

Bei der Analyse der Zellorientierung und der richtungsabhängigen Fortbewegungsgeschwindigkeiten ist zu beachten, dass, auf Grund der Wirkung der Sedimentation, der bei der Spurenauswertung ermittelte Bahnwinkel nicht mit dem

exakten Ausrichtungswinkel der Zelle übereinstimmen muss. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, unterscheidet man zwischen dem r_{oT} -Wert („trackorientation“), der sich auf den Winkel der Schwimmspur bezieht, und dem r_{oC} -Wert („cellorientation“), der die Ausrichtung der Längsachse der Zelle angibt (Machemer et al., 1997). Die für die Berechnung des r_{oC} -Wertes notwendigen individuellen Richtungswinkel β_i werden dabei um einen Winkel σ , der die Neigung der Zelle zu ihrer Schwimmbahn beschreibt, korrigiert.

$$(II.f) \quad \sigma = \arctan \frac{S \cdot \sin \beta_i}{S \cdot \cos \beta_i + V_i}$$

Aus Gleichung II.f ist erkennbar, dass sich der Unterschied zwischen r_{oT} und r_{oC} umso stärker ausprägt, je höher die Sedimentationsgeschwindigkeit (S) im Vergleich zur Fortbewegungsgeschwindigkeit (V_i) der Zelle ist.

Die Reaktion der Zellen in Bezug auf den Schwerkraftvektor wird in Polarhistogrammen dargestellt. Dabei werden sowohl die medianen Fortbewegungsgeschwindigkeiten als auch die relative Häufigkeit der Orientierungsrichtungen in definierten Winkelsektoren dargestellt. Die Sektorbreite beträgt dabei in der Regel 5° .

Die Signifikanz der Orientierungen wurde mit dem Rayleigh-Test (Batschelet, 1981) getestet. Der Unterschied zwischen zwei Orientierungspolarogrammen wurde mit dem Zwei-Stichprobentest nach Kuiper (Batschelet, 1981) mit einer Klassenbreite von 5° und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% überprüft.

Unterschiede in den Reversalraten wurden mit dem Chi-Quadrattest (4-Felder-Test) auf Signifikanz geprüft. Mit diesem Test lassen sich zwei Stichproben mit Alternativdaten („Reversal“ gegen „kein Reversal“) dahingehend überprüfen, ob sie aus einer Grundgesamtheit entstammen.

Bei der Berechnung von Regressionsgeraden wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewendet. Dazu wird die Geradengleichung mit der kleinsten Summe der Abweichungsquadrate zwischen Datenpunkten und Geraden bestimmt. Aus dieser Gleichung kann der y-Achsenabschnitt und der Regressionskoeffizient (Steigung) abgelesen werden. Als Maß für die Güte der Anpassung wird der Korrelationskoeffizient R ($-1 \leq R \leq 1$) berechnet und mit dem t-Test auf Signifikanz überprüft (Sachs, 1984).

3. Ergebnisse

3.1. Größenvermessung

Die Zellform hypotricher Ciliaten, wie *Stylonychia mytilus*, ist in der Regel nicht rotationssymmetrisch, wie beispielsweise die von *Paramecium*. Aus diesem Grund ist die Berechnung der Membranfläche und des Zellvolumens nur durch Anpassung verschiedener Bereiche des Zellkörpers an geometrische Körper möglich. Mit Hilfe von zweidimensionalen, digitalisierten Videoaufzeichnungen konnten die Quer- und die Längsachsen der Versuchszellen vermessen werden (2.3.11.). Durch mikroskopische Untersuchungen wurde die Zellhöhe mit 1/10 der Zelllänge abgeschätzt. Tabelle 3.1 zeigt die ermittelten Daten für zwei Messreihen (smg_01, smg_02).

Tab. 3.1: Geometrische Vermessung von *Stylonychia mytilus*. Angegeben sind jeweils die Mediane (Konfidenzbereiche in Klammern). Die Zellhöhe wurde als 1/10 der Längsachse abgeschätzt. Die Datenzahlen betragen 346 (smg_01) und 486 (smg_02).

Messreihe	Länge [μm]	Breite [μm]	Höhe [μm]
smg_01	210,5	100,8	21,1
1. Tag nach Fütterung	(206,2 / 213,1)	(97,2 / 100,8)	(berechnet)
smg_02	236,1	97,2	23,6
2 Tage nach Fütterung	(232 / 239)	(93,6 / 97,2)	(berechnet)

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Daten der beiden Versuchsreihen ($p=1\cdot 10^{-7}$). Die weiterführenden geometrischen Berechnungen wurden mit den Daten der Versuchsreihe smg_02 durchgeführt (Abb. 3.1), da die Zellen dieser Messreihe den Zellen der verhaltens- und elektrophysiologischen Versuche entsprechen. Das Verhältnis Querachse zu Längsachse beträgt bei dieser Messreihe 0,4. Legt man als Körperform einen Quader zu Grunde (Machemer & Deitmer, 1987), so ergibt sich die Membranfläche des Zellkörpers nach $A_s = 1,1 \cdot L^2$ (A_s : Membranfläche Soma; Zelllänge: L; Zellhöhe: 0,1 L; Zellbreite: 0,4 L).

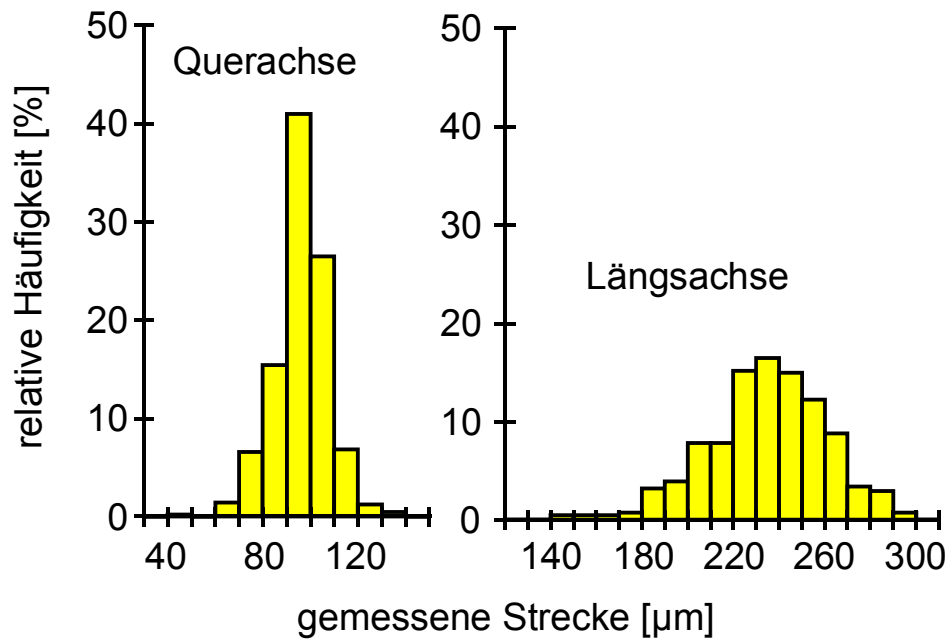


Abb. 3.1: Klassenhäufigkeitsverteilung der Zelllänge und –breite der Versuchsreihe smg_02. (N=486). Die Mediane betragen 97,2 µm (Querachse) und 236,1 µm (Längsachse); siehe auch Tab. 3.1.

Da der Zellkörper an den Seiten flach ausläuft, schätzten Machemer und Deitmer das Volumen des Zellkörpers als $2/3$ des Volumens eines Quaders ab. Daraus ergibt sich $V_s = 0,027L^3$ (V_s : Volumen Zellkörper, Längenverhältnisse s.o.). Das Volumen und die Oberfläche der Cirren, der Membranellen und der undulierenden Membran müssen auf Grund der Größe dieser Organellen berücksichtigt werden und lassen sich von der Längsachse ableiten (Machemer & Deitmer, 1987).

Tab. 3.2: Berechnungen der Membranoberfläche von *Stylonychia mytilus*

Zellbereich	Berechnung	Oberfläche [µm ²]	Oberfläche [cm ²]
Soma	$1,1 \cdot L^2$	61317,5	$6,1 \cdot 10^{-4}$
Membranellen	$1,57 \cdot L^2$	87516,8	$8,8 \cdot 10^{-4}$
Cirren	$0,88 \cdot L^2$	49054	$4,9 \cdot 10^{-4}$
undulierende Membran	$0,04 \cdot L^2$	2229,7	$2,2 \cdot 10^{-5}$
Gesamt	$3,59 \cdot L^2$	200118,1	$2 \cdot 10^{-3}$

Die Einbeziehung der Cirren, Membranellen und der undulierenden Membran hat einen deutlichen Einfluss auf die Membranoberfläche der Zelle, während das Zellvolumen nahezu konstant bleibt. Die Gesamtfläche der Membran wird für die Berechnung der elektrischen Membraneigenschaften zu Grunde gelegt (3.3.3.).

Tab. 3.3: Berechnung des Zellvolumens von *Stylonychia mytilus*

Zellbereich	Berechnung	Volumen [μm^3]	Volumen [cm^3]
Soma	$0,027 \cdot L^3$	355346,2	$3,55 \cdot 10^{-7}$
Membranellen	$0,098 \cdot L^2$	5462,8	$5,5 \cdot 10^{-9}$
Cirren	$0,055 \cdot L^2$	3065,9	$3,1 \cdot 10^{-9}$
undulierende Membran	$0,0026 \cdot L^2$	144,9	$1,4 \cdot 10^{-10}$
Gesamt	$0,028 \cdot L^3$	364019,8	$3,6 \cdot 10^{-7}$

Aus Zellvolumen (Soma) und mittlerer Dichte der Zelle kann die Kraft berechnet werden, mit der das Cytoplasma auf die jeweils unten liegende Membran einwirkt. Bei den bisher untersuchten Ciliaten konnte eine Dichte von etwa $1,04 \text{ g/cm}^3$ ermittelt werden (Kuroda & Kamiya, 1989; Neugebauer et al., 1998; Watzke, 2000). Legt man diesen Wert auch für *Stylonychia* zu Grunde, so ergibt sich eine resultierende Masse von $1,42 \cdot 10^{-11} \text{ kg}$. Diese Masse übt bei normaler Erdbeschleunigung eine Kraft von $1,39 \cdot 10^{-10} \text{ N}$ auf die jeweils unten liegende Membran aus. Durch diese Kraft werden, gemäß der speziellen Statocystenhypothese (1.2.4.), mechanosensitive Ionenkanäle geöffnet. Es wird angenommen, dass die Öffnung dann erfolgt, wenn das Kanalprotein um eine Strecke von 3,5 nm deformiert wird (analog zu mechanosensitiven Haarsinneszellen im Innenohr der Vertebraten, Howard et al., 1988). Eine Multiplikation dieser Strecke mit der zur Verfügung stehenden Kraft ($1,39 \cdot 10^{-10} \text{ N}$) ergibt eine für die Gravitransduktion von *Stylonychia* maximal zur Verfügung stehende Energie von $4,9 \cdot 10^{-19} \text{ Nm}$. Diese Energie liegt um den Faktor 245 über der Energie des thermischen Rauschens ($2 \cdot 10^{-21} \text{ Nm}$).

3.2. Verhaltensphysiologische Untersuchungen

3.2.1. Sedimentationsgeschwindigkeit

Für die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde *Stylonychia mytilus* mit einer 2 mM NiCl_2 -Lösung behandelt. Innerhalb von 10 Minuten nach dem Einbringen der Versuchszellen in die Lösung war ein Großteil der Population vollständig immobilisiert. Im mikroskopischen Bild konnte nur bei wenigen Zellen eine Restaktivität einzelner Cirrengruppen und des adoralen Membranellenbandes beobachtet werden. Zur Auswertung gelangten nur die Spuren, deren Richtung parallel zum Schwerkraftvektor war und die einen geradlinigen Verlauf zeigten. Eine Veränderung der Zellform wurde etwa 45 Minuten nach dem ersten Kontakt mit der NiCl_2 -Lösung erkennbar. Die Zellen zeigten dann Aufquellungen, bei einigen wurde das anteriore Membranellenband abgestoßen. Die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde daher auf 30 Minuten beschränkt.

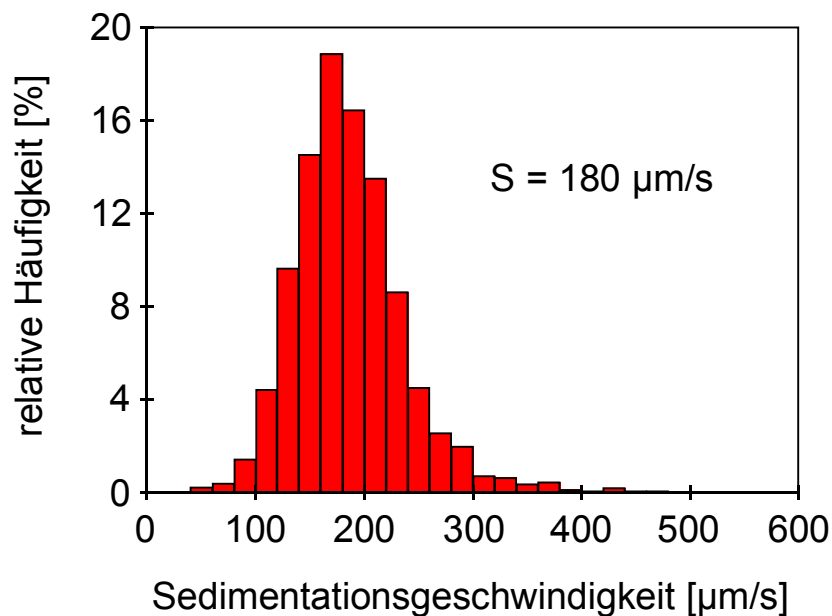


Abb. 3.2: Klassenhäufigkeitsverteilung der Sedimentationsgeschwindigkeit Nickel-immobilisierter Zellen von *Stylonychia mytilus*. Der Median beträgt 180 $\mu\text{m/s}$. Die Daten unterliegen annähernd einer Normalverteilung ($N=2549$).

Die in den Vorversuchen ermittelte mediane Sedimentationsgeschwindigkeit beträgt $180 \mu\text{m/s}$ (95%-Konfidenzbereich: $178 \mu\text{m/s}$, $183 \mu\text{m/s}$; $N=2549$). Die Daten scheinen annähernd einer Normalverteilung zu entsprechen (Abb. 3.2).

Abbildung 3.3 zeigt, dass sich die Sedimentationsgeschwindigkeit während der 30-minütigen Messzeit nur unwesentlich ändert ($0,5 \mu\text{m/Minute}$). Dies deutet auf eine geringe Änderung der Zellform während des Versuchszeitraumes hin.

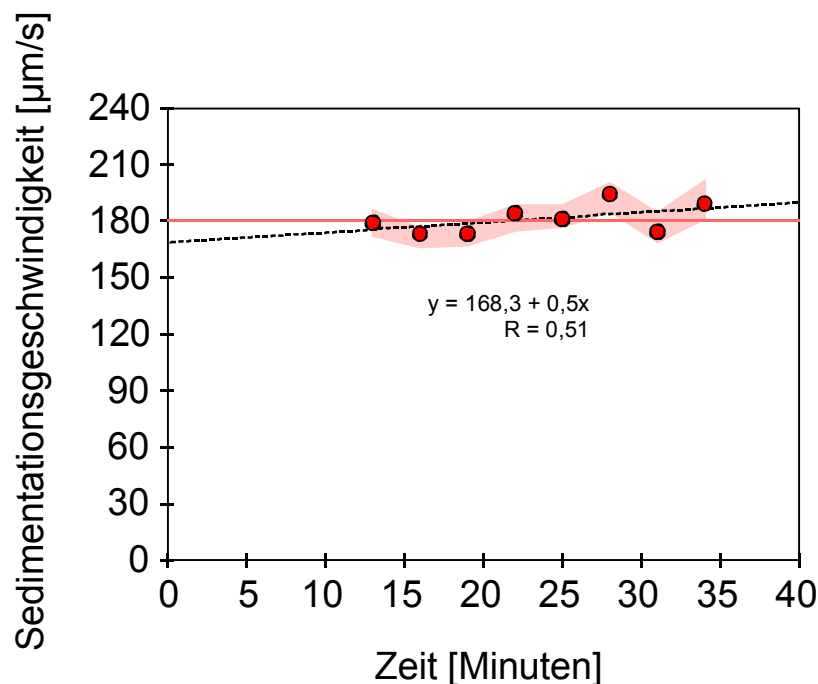


Abb. 3.3: Veränderung der Sedimentationsgeschwindigkeit während der Versuchszeit. Die rote Linie stellt den Median ($180 \mu\text{m/s}$), die schraffierte Fläche den 95%-Konfidenzbereich der Messwerte dar. Es ist innerhalb des Messzeitraumes keine wesentliche Veränderung der Sedimentationsgeschwindigkeit feststellbar.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit von *Stylonychia mytilus* hängt im Bereich von 1 g bis 2 g linear von der Beschleunigung ab und nimmt pro g-Stufe um $111 \mu\text{m/s}$ zu (Abb. 3.4). Der bei 2 g ermittelte Wert weicht nach unten leicht von der linearen Beziehung ab. Bei 0 g ist eine Sedimentationsgeschwindigkeit von $0 \mu\text{m/s}$ zu erwarten. Die Regressionsgerade schneidet die Ordinate bei $7 \mu\text{m/s}$. Diese geringe Abweichung vom Ursprung ist statistisch nicht signifikant.

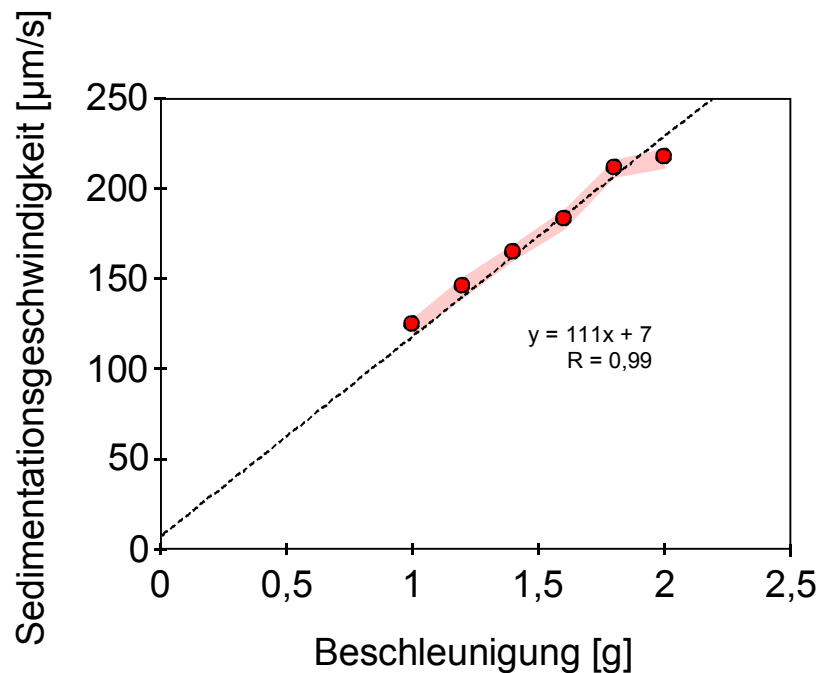


Abb. 3.4: Abhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit (S) von der Beschleunigung. Die Konfidenzbereiche des Medians sind hellrot dargestellt. Pro Datenpunkt wurden durchschnittlich 1300 Messungen durchgeführt. Der Betrag von S nimmt pro g-Stufe um 111 µm/s zu.

Die Sedimentationsgeschwindigkeiten bei 1 g aus den Vorversuchen und aus den Zentrifugenversuchen unterscheiden sich signifikant ($p = 5 \cdot 10^{-7}$). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf Abweichungen in der Versuchsdurchführung.

Um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erreichen, wurde die Versuchskammer in den Zentrifugenexperimenten erst unmittelbar vor der Aufnahme um 90° - von der horizontalen in die vertikale Position - gedreht. Die Zellen sedimentierten aber offensichtlich bereits bei horizontal gestellter Versuchskammer in Richtung Kammerwand. Nach der Drehung in die vertikale Kammerposition sedimentieren die Zellen dadurch näher an der Wand. Bei den Vorversuchen war keine Drehung der Versuchskammer um 90° nötig, da die Messung sofort nach dem Einsetzen erfolgte. Die Zellen sedimentierten zum Großteil in der Mitte der Versuchskammer.

Für die nachfolgenden Berechnungen der Gravikinesewerte und für die Korrekturen der individuellen Richtungswinkel (2.6.) wurden, auf Grund der ähnlichen Versuchsabläufe, die Sedimentationsgeschwindigkeiten aus den Zentrifugenversuchen zu Grunde gelegt.

Die bei unterschiedlichen Beschleunigungswerten in der Zentrifuge ermittelten medianen Sedimentationsgeschwindigkeiten sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Mediane Sedimentationsgeschwindigkeiten (S) bei verschiedenen Beschleunigungen (a_r). Die Daten sind Abbildung 3.4 grafisch dargestellt.

a_r [g]	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
S [$\mu\text{m/s}$]	124	146	164	183	211	217

Um zu überprüfen, ob der Graviorientierung von *Stylonychia* ein physikalischer Mechanismus zu Grunde liegt, wurde die Ausrichtung sedimentierender Zellen in Bezug auf den Schwerkraftvektor analysiert. Aus mehreren Experimenten unter 1 g wurden insgesamt 835 Zellen, anhand der Ausrichtung ihrer Längsachse, vertikalen und horizontalen 90°-Sektoren (2.6.) zugeordnet. Es sedimentierten deutlich mehr Zellen (Tab. 3.5; 60,3%) mit ihrer Längsachse parallel zum Schwerkraftvektor, wobei die maximale Abweichung $\pm 45^\circ$ betrug. Von 16,9% der Zellen konnte die Ausrichtung nicht bestimmt werden. Dies lag daran, dass die Längsachse nicht eindeutig erkannt werden konnte.

Tab. 3.5: Relative und absolute Häufigkeit sedimentierender Zellen in Abhängigkeit der Ausrichtung zum Schwerkraftvektor. Als vertikal sedimentierend wurden die Zellen gewertet, deren Längsachse um nicht mehr als $\pm 45^\circ$ von der Senkrechten (parallel zum Schwerkraftvektor) abwichen. Anteriorer und posteriorer Zellpol ließen sich nicht unterscheiden.

Ausrichtung	vertikal	horizontal	nicht bestimmbar
relative Häufigkeit	60,3 %	22,8 %	16,9 %
absolute Häufigkeit	519	183	133

Eine entsprechende Auswertung war für die Zentrifugendaten nicht möglich. Auch konnte nicht bestimmt werden, in welche Richtung jeweils der anteriore und der posteriore Zellpol gerichtet war.

3.2.2. Adaptation an unterschiedliche Experimentierlösungen

Das Adaptationsverhalten von *Stylonychia mytilus* wurde nach dem Einbringen in unterschiedliche Lösungen (1-1-1, Pringsheim-Lösung, Kulturlösung) untersucht. Die Versuche in Kulturlösung dienten als Kontrolle. Es wurde zunächst die Aktivität (Beweglichkeit) der Versuchszellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Befüllen der Versuchskammern analysiert.

Abbildung 3.5 zeigt, dass die Aktivität der Zellen sofort nach dem Befüllen der Versuchskammern ($t=0$ Stunden) herabgesetzt ist. Dies ist besonders bei den Versuchszellen in Pringsheim-Lösung und in 1-1-1-Lösung zu erkennen. Bei diesen Zellen ist innerhalb der ersten 1,5 Stunden nach Versuchsbeginn eine Reaktivierung um 100% zu beobachten. Im weiteren Versuchsverlauf ist bei allen Zellen innerhalb der ersten 10 Stunden ein leichter Anstieg der Aktivität zu beobachten. Das Maximum der Aktivität ist bei allen Versuchsreihen nach 8 Stunden erreicht.

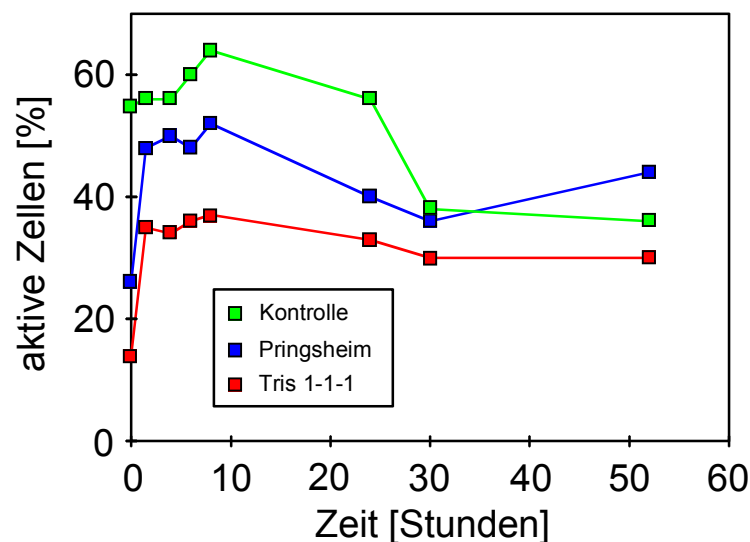


Abb. 3.5: Aktivität von *Stylonychia mytilus* in unterschiedlichen Experimentierlösungen. Es ist jeweils der Anteil an Zellen angegeben, der, gemessen an der Gesamtzahl der Versuchszellen, eine Fortbewegung zeigte. Pro Datenpunkt wurden durchschnittlich 250 Zellen ausgewertet.

Während sich nach 30 Stunden die Aktivität der Zellen in Pringsheim-Lösung und der Zellen der Kontrollversuche angleichen, bleibt sie in 1-1-1-Lösung mit 29% etwas erniedrigt.

Neben der Aktivität der Zellen wurde der Einfluss der Experimentierlösung auf die Fortbewegungsgeschwindigkeit untersucht. Abbildung 3.6 zeigt die medianen Geschwindigkeiten von Versuchszellen in horizontaler Versuchskammer zu verschiedenen Zeiten nach dem Befüllen.

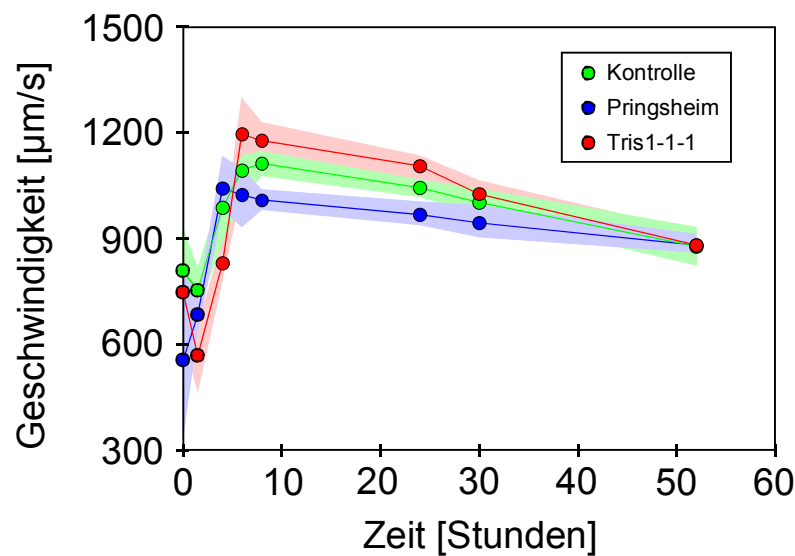


Abb. 3.6: Geschwindigkeiten von *Stylonychia mytilus* in verschiedenen Experimentierlösungen bei horizontal gestellter Versuchskammer. Angegeben ist jeweils der Median, die 95%-Konfidenzbereiche sind farbig hinterlegt (pro Datenpunkt durchschnittlich 270 Messungen).

Die mediane Geschwindigkeit der Zellen in Pringsheim-Lösung nimmt während der ersten 4 Stunden nach dem Befüllen der Versuchskammer um etwa 500 µm/s zu. Dagegen nimmt die Geschwindigkeit der Zellen in den anderen beiden Ansätzen zunächst ab. Die höchsten Geschwindigkeiten werden in einem Zeitraum vier bis acht Stunden nach Versuchsbeginn gemessen, danach werden die Zellen in allen drei Ansätzen kontinuierlich langsamer. Bis 30 Stunden nach Versuchsbeginn besteht ein signifikanter Unterschied in den gemessenen Geschwindigkeiten der drei Versuchsansätze. Dieser Unterschied verschwindet erst 52 Stunden nach Ver-

suchsbeginn. Die Versuchszellen in den unterschiedlichen Lösungen bewegen sich dann mit einer medianen Geschwindigkeit von $981 \mu\text{m/s}$ fort.

Durch die Analyse des Bewegungsverhaltens der Zellen in der vertikalen Versuchskammer konnte der Einfluss der unterschiedlichen Versuchslösungen auf die Schwerkraftwahrnehmung von *Stylonychia* untersucht werden. Abbildung 3.7 stellt die Veränderung der Orientierungskoeffizienten der drei Versuchsreihen dar.

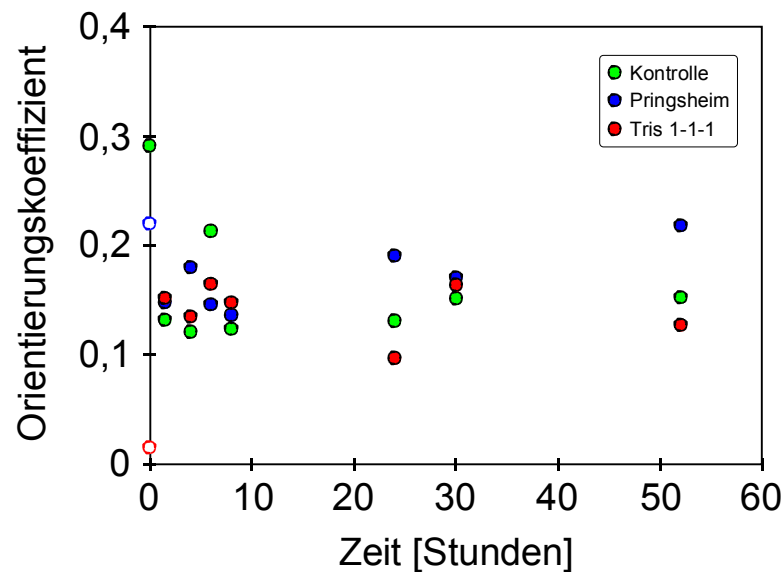


Abb. 3.7: Präzision der Orientierung von Versuchszellen in unterschiedlichen Versuchslösungen, dargestellt durch den Orientierungskoeffizienten. Die Zellen in Pringsheim-Lösung und in Tris-1-1-1-Lösung zeigen zum Zeitpunkt "0 Stunden" keine signifikante Orientierung (leere Symbole). Es kann über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikante Veränderung des Orientierungskoeffizienten nachgewiesen werden (pro Datenpunkt etwa 300 Messungen).

Während des gesamten Versuchszeitraumes kann keine signifikante Veränderung der Orientierungskoeffizienten nachgewiesen werden. Die Präzision der Orientierung hängt auch nicht davon ab, welche Versuchslösung gewählt wurde.

Die Auswertung der Gravikinese ergab die in Abbildung 3.8 dargestellten Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Befüllen der Versuchskammern. Während der ersten Stunden nach Versuchsbeginn ist eine starke Streuung der Gravikinesewerte zu erkennen. Die Sedimentationsgeschwindigkeit von $111\ \mu\text{m/s}$ kann in einigen Fällen nur schlecht kompensiert werden ($< 30\%$). Über den gesamten Versuchszeitraum ist ein Trend zu einer Verbesserung der Kompensationsfähigkeit zu bemerken, was daran erkannt werden kann, dass der Betrag der Gravikinese mit zunehmender Adaptationszeit größer wird. Dieser Effekt ist unabhängig davon welche Experimentierlösung benutzt wurde. Auf Grund der Streuung der Datenpunkte in den ersten Stunden nach dem Befüllen der Kammern, ist es nicht gelungen eine Regressionsanalyse durchzuführen.

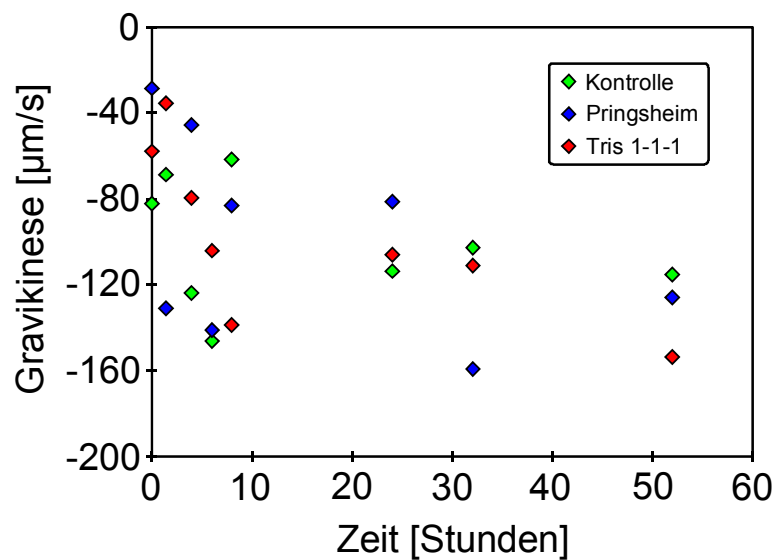


Abb. 3.8: Darstellung der Gravikinese von Zellen in unterschiedlichen Experimentierlösungen über einen Zeitraum von 52 Stunden. Innerhalb der ersten 8 Stunden nach dem Befüllen der Kammern unterliegen die berechneten Gravikinesen starken Schwankungen. Über den gesamten Zeitraum ist ein Trend zu höheren Werten zu erkennen (pro Datenpunkt etwa 250 Messungen).

3.2.3. Stoßversuche

Durch stoßartiges Verschieben des Flüssigkeitsvolumens in der Versuchskammer wurde die Veränderung der Fortbewegungsgeschwindigkeit von *Stylonychia mytilus* nach einer allseitigen mechanischen Stimulation untersucht. Aus der resultierenden Geschwindigkeitsänderung können Rückschlüsse gezogen werden, wie sich die durch die beiden Rezeptorpopulationen hervorgerufenen Veränderungen des Membranpotentials in der Summation ausprägen.

Abbildung 3.9 zeigt die Veränderung der Fortbewegungsgeschwindigkeiten vor und nach Reizgabe bei horizontal gestellter Versuchskammer. Für die Analyse wurden jeweils drei Videoaufzeichnungen vor und nach dem Reiz ausgewertet. Da sich die Geschwindigkeiten vor der mechanischen Stimulation nicht unterschieden, wurden diese als Referenzwert für das jeweilige Reizmuster zusammengefasst.

Eine einmalige Reizgabe führt über einen Zeitraum von 60 Sekunden zu einer Reduktion der Fortbewegungsgeschwindigkeit um etwa 60 $\mu\text{m/s}$. Danach steigt die Geschwindigkeit wieder an und ist gegenüber dem Referenzwert um 30 $\mu\text{m/s}$ erhöht. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Ein zweimaliges Wiederholen des Reizes führt über den gesamten Analysezeitraum zu einer kontinuierlichen Verringerung der Geschwindigkeit. Nach 90 Sekunden bewegen sich die Versuchszellen mit einer Geschwindigkeit von 850 $\mu\text{m/s}$ und damit um etwa 80 $\mu\text{m/s}$ langsamer fort.

Eine zunächst leichte, jedoch statistisch nicht signifikante, Erhöhung der Geschwindigkeit kann nach einer dreimaligen Wiederholung des Stoßreizes gemessen werden. Im weiteren Zeitverlauf nimmt die Geschwindigkeit wieder ab und erreicht nach 90 Sekunden einen Wert von 880 $\mu\text{m/s}$.

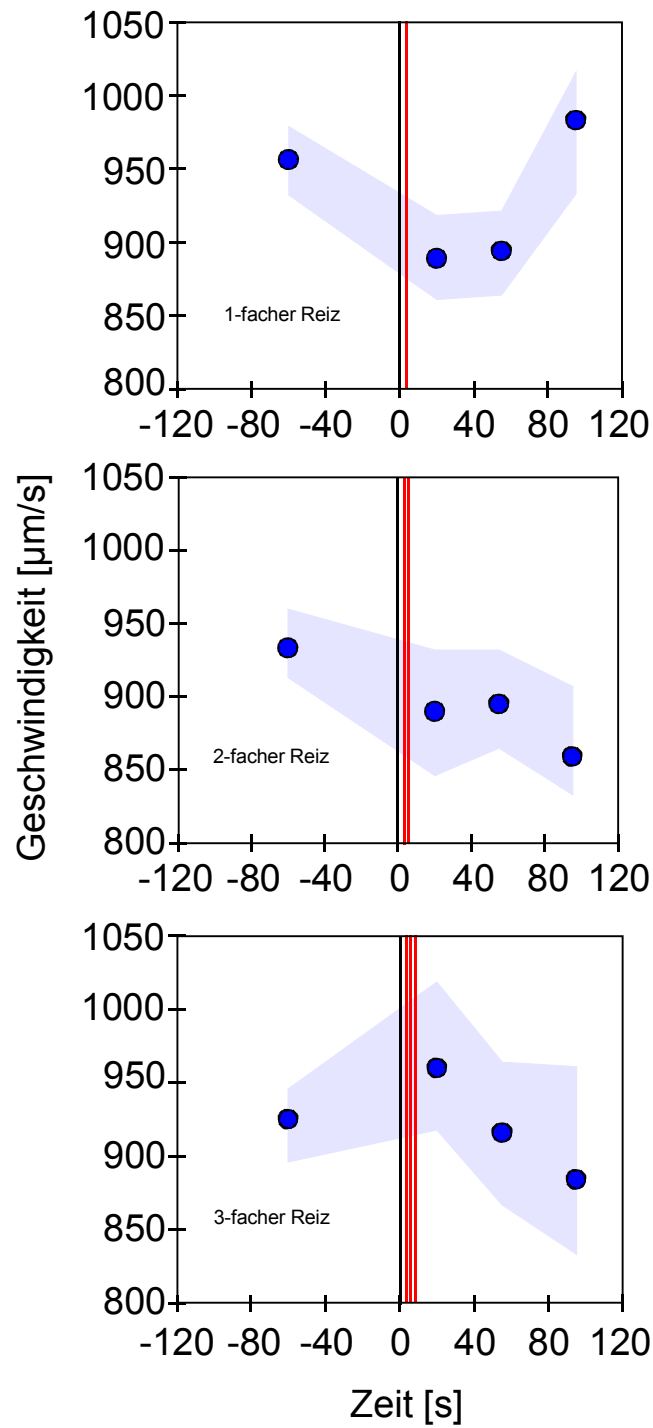


Abb. 3.9: Veränderung der medianen Fortbewegungsgeschwindigkeiten horizontal laufender Zellen nach ein-, zwei- und dreimaligem Stoßreiz. Eine Verschiebung des Flüssigkeitsraumes in der Versuchskammer führt zu einer allseitigen mechanischen Stimulation der Versuchszellen. Pro Datenpunkt erfolgten mindestens 300 Messungen, die Konfidenzbereiche sind blau unterlegt.

3.2.4. Verhalten unter normaler Erdbeschleunigung

Um Aussagen über das schwerkraftabhängige Verhalten von *Stylonychia* bei normaler Erdbeschleunigung (1g) machen zu können, wurden Videoaufzeichnungen bei stehender Zentrifuge durchgeführt. In Abbildung 3.10 sind Polarhistogramme der Orientierung und der Geschwindigkeit von Zellen in vertikaler und horizontaler Versuchskammer dargestellt.

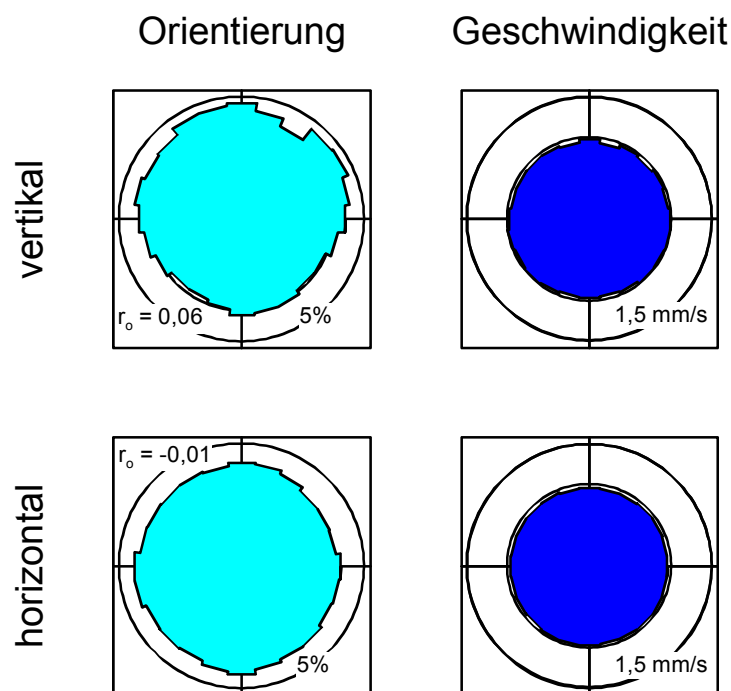


Abb.3.10: Polarhistogramme der Orientierung und der Geschwindigkeit von *Stylonychia mytilus* in vertikaler (oben) und horizontaler (unten) Versuchskammer. In der vertikalen Kammer konnte eine signifikante, dem Schwerkraftvektor entgegengerichtete, Orientierung nachgewiesen werden. In horizontaler Versuchskammer ist keine bevorzugte Fortbewegungsrichtung zu messen. Die Datenzahl beträgt 21517 (vertikal) und 15287 (horizontal).

Stylonychia zeigt bei vertikaler Kammerstellung eine negative Gravitaxis. Der Orientierungskoeffizient beträgt 0,06 und ist damit im Vergleich zu anderen Ciliaten relativ niedrig. Die bestehende Signifikanz der Orientierung konnte mit dem Rayleigh-Test nachgewiesen werden.

Bei horizontaler Kammerstellung konnte keine bevorzugte Orientierung der Zellen nachgewiesen werden. Der Orientierungskoeffizient ($-0,01$) ist trotz des großen Stichprobenumfangs nicht signifikant.

Die Fortbewegungsgeschwindigkeit von *Stylonychia* ist, unabhängig von der Lage der Versuchskammer, für alle Fortbewegungsrichtungen gleich groß.

Für die Analyse der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten wurden die Geschwindigkeitsdaten von Zellen aus der vertikalen Kammer in Abhängigkeit von der Zellorientierung 90°-Sektoren zugeordnet (2.6.) und der Median für jeden Sektor bestimmt.

Tabelle 3.5 gibt die medianen Fortbewegungsgeschwindigkeiten horizontal laufender (V_H), aufwärts laufender (V_U) und abwärts laufender (V_D) Zellen bei vertikal gestellter Kammer an.

Tab. 3.6: Mediane richtungsabhängige Geschwindigkeiten berechnet für 90°-Sektoren der Bewegungsrichtung (Konfidenzbereiche in Klammern, N = Datenzahl) bei vertikal gestellter Versuchskammer unter 1 g.

	mediane Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	N
V_U	972 (960 / 981)	5818
V_H	993 (982 / 1000)	5484
V_D	975 (961 / 987)	4840

Die mediane Geschwindigkeit der Zellen in der horizontal gestellten Versuchskammer beträgt 973 $\mu\text{m/s}$ (Konfidenzbereich 966 $\mu\text{m/s}$ bis 980 $\mu\text{m/s}$) und ist damit um 20 $\mu\text{m/s}$ geringer als bei „horizontal“ laufenden Zellen in der vertikalen Versuchskammer.

Wie auch schon aus dem Polarhistogramm ersichtlich, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschwindigkeiten auf- und abwärtslaufender Zellen statistisch gesichert werden.

Anhand der Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeiten kann unter Berücksichtigung der Sedimentationsgeschwindigkeit die Gravikinese (Δ) berechnet werden

(I.f). Für die Berechnung der Gravikinese von aufwärts- und abwärtslaufenden Zellen (Δ_U , Δ_D) ist es notwendig, den schwerkraftunabhängigen Vortrieb (P) der Zelle zu kennen. Näherungsweise kann für den P-Wert die Geschwindigkeit horizontal laufender Zellen angenommen werden, da sich auf Grund der bipolaren Verteilung der mechanosensitiven Kanäle (1.2.3.) die anterioren und posterioren Rezeptorpotentiale aufheben und dadurch keine Gravikinese ausgebildet wird. In Tabelle 3.6 sind die so berechneten Gravikinesewerte dargestellt.

Tab. 3.7: Gravikinesewerte von *Stylonychia mytilus* bei normaler Erdbeschleunigung. Für den P-Wert wurden die Geschwindigkeiten horizontal laufender Zellen aus der horizontal gestellten ($P_H = 973 \mu\text{m/s}$) oder aus der vertikal gestellten ($P_V = 993 \mu\text{m/s}$) Versuchskammer angenommen.

	S	$V_D - V_U$	Δ	Δ_U	Δ_D
P_H	111 $\mu\text{m/s}$	3 $\mu\text{m/s}$	-109,5 $\mu\text{m/s}$	-110 $\mu\text{m/s}$	-109 $\mu\text{m/s}$
P_V	111 $\mu\text{m/s}$	3 $\mu\text{m/s}$	-109,5 $\mu\text{m/s}$	-90 $\mu\text{m/s}$	-129 $\mu\text{m/s}$

Der berechnete Wert für Δ ist auf Grund des in 2.6. beschriebenen Tests signifikant. Damit konnte für *Stylonychia mytilus* eine negative Gravikinese nachgewiesen werden, welche die Sedimentationsgeschwindigkeit um nahezu 100% kompensiert. Die Gravikinesen beim Abwärtslaufen und beim Aufwärtslaufen tragen gleichermaßen zur Kompensation der Sedimentation bei. Der Betrag der richtungsabhängigen Gravikinesewerte hängt jedoch davon ab, welcher P-Wert der Berechnung zu Grunde liegt. Eine bessere Abschätzung des P-Wertes kann auf Grund von Experimenten in der Zentrifuge und unter Schwerelosigkeitsbedingungen erfolgen.

3.2.5. Verhalten bei erhöhter Beschleunigung

Um die Wirkung eines Reizes auf ein perzipierendes System zu untersuchen, ist es hilfreich die Reizstärke zu variieren. Versuchszellen, die in der vertikalen Kammer verschiedenen Beschleunigungen ausgesetzt werden, zeigen eine veränderte Fortbewegungsgeschwindigkeit (Abb. 3.11).

Die Geschwindigkeiten abwärtslaufender Zellen nehmen mit steigender Beschleunigung zu, während die Geschwindigkeiten aufwärtslaufender Zellen leicht abnehmen. Dies führt dazu, dass die Differenzen der Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeiten mit steigender Beschleunigung größer werden. Die Geschwindigkeit horizontal laufender Zellen bleibt nahezu konstant. Bei der Betrachtung der Kurven fallen zwei Unstetigkeiten bei 1,3 g und bei 2,5 g auf. In beiden Fällen nimmt die Geschwindigkeit der Zellpopulation, unabhängig von der Fortbewegungsrichtung, ab. Dieser Umstand kann nicht durch Unregelmäßigkeiten bei der Versuchsdurchführung oder zu geringe Datenzahlen erklärt werden; die Konfidenzbereiche des Medians sind niedrig. Eine besondere Überprüfung der Messwerte ergab denselben Befund.

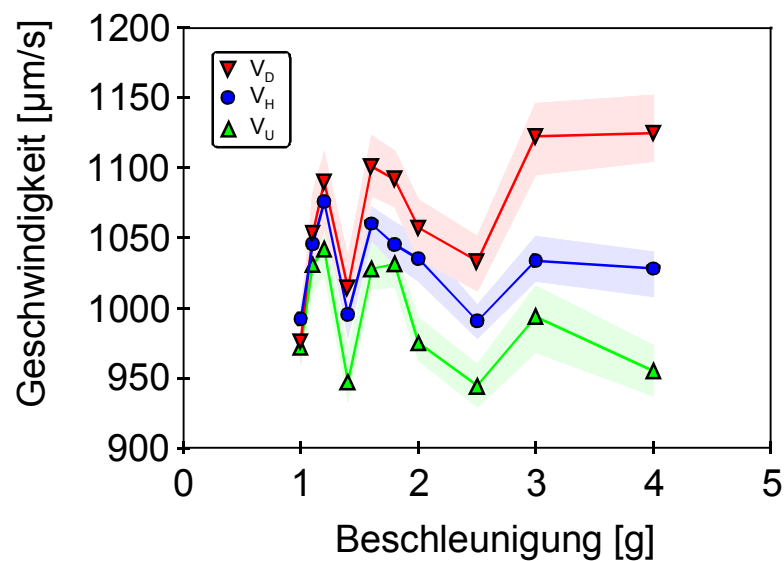


Abb. 3.11: Veränderung der medianen richtungsabhängigen Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von der resultierenden Beschleunigung (Konfidenzbereiche farbig unterlegt, pro Datenpunkt etwa 2000 Messungen). Dargestellt sind die Geschwindigkeiten abwärts (V_D), aufwärts (V_U) und horizontal laufender Zellen (V_H).

Die Unterschiede zwischen Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeit sind ab einer Beschleunigung von 1,2 g statistisch signifikant ($p < 5 \cdot 10^{-7}$).

Bei der Analyse der beschleunigungsabhängigen Geschwindigkeiten ist jedoch zu beachten, dass die dargestellten Veränderungen zum Teil auch durch die Wirkung

der Sedimentation erklärt werden können. Die Sedimentationsgeschwindigkeit nimmt pro g-Stufe um $111 \mu\text{m/s}$ zu (3.2.1.). Dies führt dazu, dass abwärtslaufende Zellen schneller, aufwärtslaufende Zellen dagegen langsamer werden. Werden die richtungsabhängigen Geschwindigkeiten um die Sedimentationsgeschwindigkeiten korrigiert, so ergibt sich daraus die aktive Änderung der Geschwindigkeit durch die Zelle (Abb. 3.12). Um die Sedimentation zu kompensieren, müssen

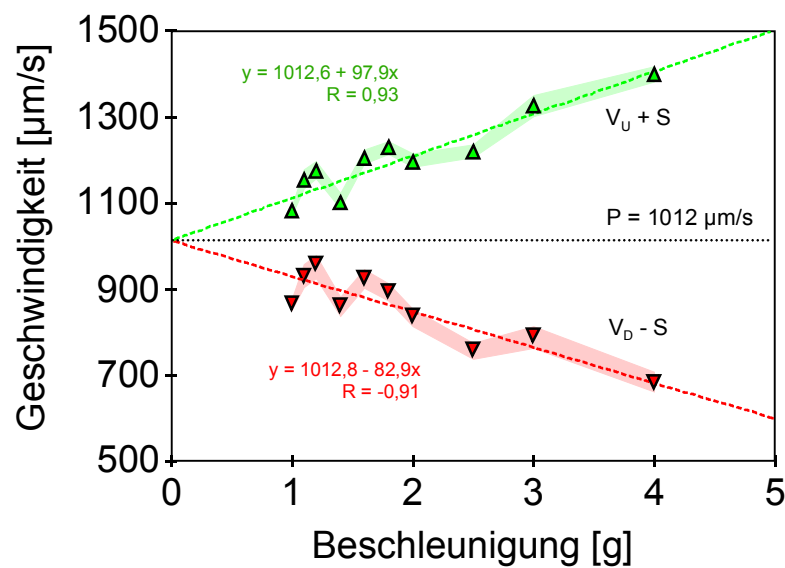


Abb. 3.12: Darstellung der um die Sedimentationsgeschwindigkeit korrigierten Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Beschleunigung (Konfidenzbereiche farbige unterlegt). Durch Extrapolation auf 0 g kann der schwerkraftunabhängige Vortrieb (P) abgeschätzt werden (Berechnung der Regressionsgeraden ohne Daten von 1,0 g bis 1,2 g, s. Text).

aufwärtslaufende Zellen ihre Geschwindigkeit mit steigender Beschleunigung erhöhen, abwärtslaufende Zellen dagegen aktiv verlangsamen. Die um S korrigierten Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeiten unterscheiden sich bei jeder g-Stufe signifikant, was bedeutet, dass die zu Grunde liegenden Gravikinesewerte ebenfalls statistisch signifikant sind.

Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgte ohne die Daten der Beschleunigungen von 1,0 g bis 1,2 g, da die Zellen hier ein verändertes beschleunigungsabhängiges Verhalten zeigten (s.u.).

Durch Extrapolation der Regressionsgeraden auf 0 g kann auf den schwerkraftunabhängigen Vortrieb (P) der Zellen zurückgeschlossen werden. Der so abgeschätzte Wert beträgt $1012 \mu\text{m/s}$ und ist damit höher als die Geschwindigkeit horizontal laufender Zellen bei 1 g.

Die sich unterscheidenden Steigungen der Regressionsgeraden für V_D-S und V_U+S deuten daraufhin, dass die richtungsabhängigen Gravikinesen (Δ_D und Δ_U) mit steigender Beschleunigung unterschiedlich stark zur Kompensation der Sedimentationsgeschwindigkeit beitragen.

Die Darstellung der Geschwindigkeitsdifferenzen auf- und abwärtslaufender Zellen (Abb. 3.13) zeigt eine zweigeteilte Kurve. In einem Bereich niedriger Beschleunigungen (bis 1,2 g) nimmt die Geschwindigkeitsdifferenz in Abhängigkeit von der Beschleunigung schnell zu, während ab einer Beschleunigung von 1,3 g die Kurve flacher verläuft.

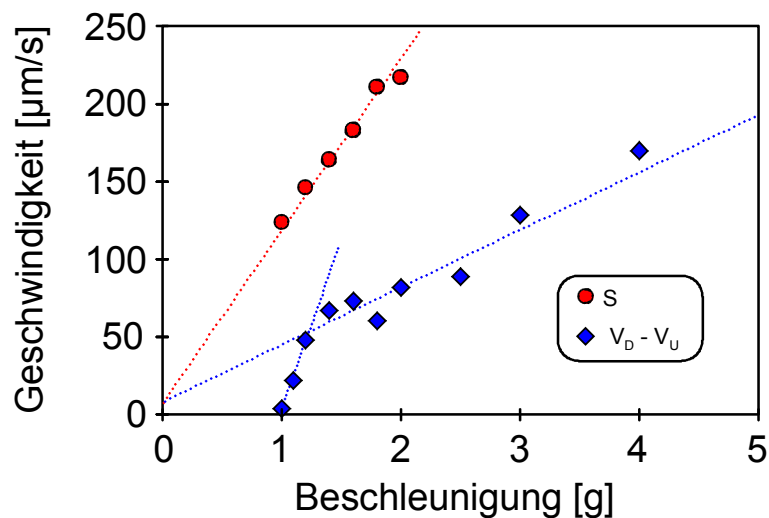


Abb. 3.13: Darstellung der beschleunigungsabhängigen Geschwindigkeitsdifferenzen ($V_D - V_U$) und der Sedimentationsgeschwindigkeit. Im Bereich von 1,0 g bis 1,2 g nimmt die Geschwindigkeitsdifferenz schneller zu als bei höheren Beschleunigungen.

Ebenfalls in Abb. 3.13 sind die Sedimentationsgeschwindigkeiten dargestellt. Die unterschiedlichen Steigungen verdeutlichen, dass die Geschwindigkeitsdifferen-

zen weder bei niedrigen noch bei hohen Beschleunigungen auf die alleinige Wirkung von S zurückzuführen sind.

Abbildung 3.14 zeigt die Veränderung der Gravikinese von *Stylonychia* in Abhängigkeit von der Beschleunigung. Der Betrag der Gravikinese bleibt in einem Bereich von 1 g - 1,2 g konstant und nimmt dann linear mit der Beschleunigung zu. Die richtungsabhängigen Gravikinesen (Tab. 3.7) der abwärtslaufenden Zellen nehmen im unteren Beschleunigungsbereich (1 g - 1,2 g) vom Betrag her ab, während die der aufwärtslaufenden Zellen, gemäß der spezialisierten Statocystenhypothese zunehmen. Ab 1,3 g kann ein linearer Zusammenhang zwischen den richtungsabhängigen Gravikinesen und der Beschleunigung nachgewiesen werden.

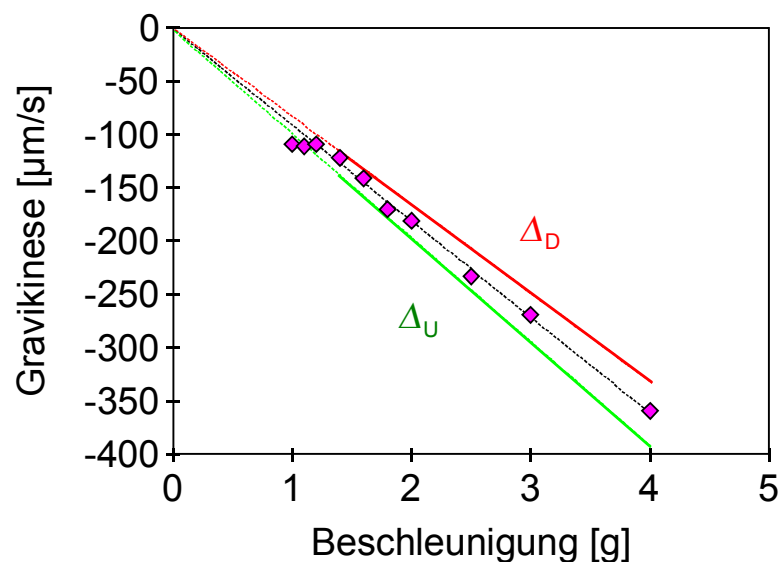


Abb. 3.14: Gravikinese von *Stylonychia* bei unterschiedlichen Beschleunigungen. Der Betrag der generalisierten Gravikinese (Rauten) nimmt, ebenso wie die Gravikinesen der auf- und abwärtslaufenden Zellen (ohne Datenpunkte zur Übersichtlichkeit), in einem Bereich von 1,3 g bis 4,0 g zu. Wie zu erwarten schneiden die Regressionsgeraden die Ordinate im Ursprung. In einem Bereich von 1,0 g bis 1,2 g bleibt die generalisierte Gravikinese konstant (richtungsabhängige Gravikinesen s. Tab. 3.7).

Alle Regressionsgeraden treffen, gemäß der Statocystenhypothese, im Ursprung zusammen.

Tab. 3.8: Richtungsabhängige Gravikinesen auf- und abwärtslaufender Zellen (Δ_U , Δ_D) im Beschleunigungsbereich 1,0 bis 1,2 g.

	1,0 g	1,1 g	1,2 g
Δ_D	-147 $\mu\text{m/s}$	-81 $\mu\text{m/s}$	-55 $\mu\text{m/s}$
Δ_U	-71 $\mu\text{m/s}$	-141 $\mu\text{m/s}$	-163 $\mu\text{m/s}$
Δ	-109 $\mu\text{m/s}$	-111 $\mu\text{m/s}$	-109 $\mu\text{m/s}$

Das Verhältnis Δ/S verdeutlicht wie gut ein Organismus in der Lage ist, die Auswirkungen einer Sedimentation durch Ausbilden einer Gravikinese zu kompensieren. In Abbildung 3.15 wird die Kompensationsfähigkeit der überwiegend auf

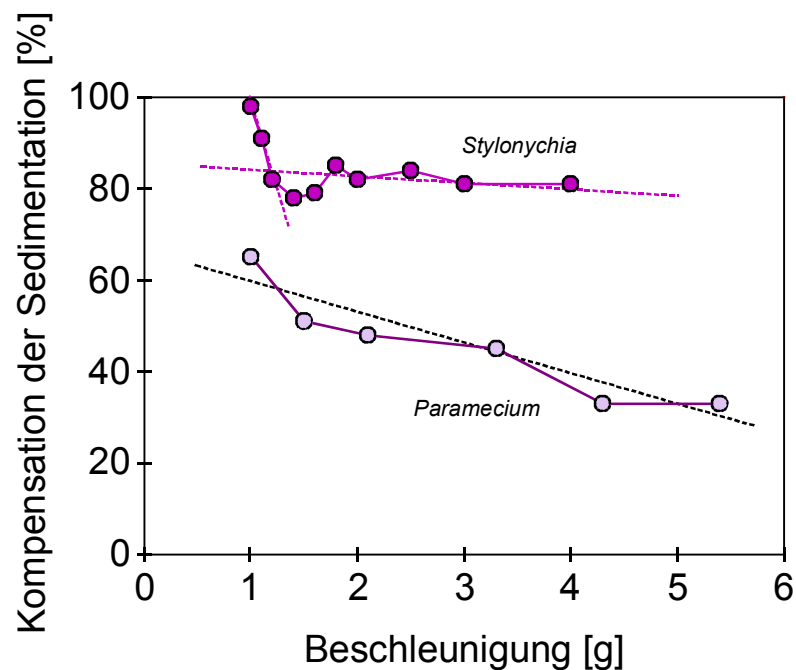


Abb. 3.15: Vergleich der Kompensationsfähigkeit von *Stylonychia mytilus* und *Paramecium caudatum* in Abhängigkeit von der Beschleunigung. Während bei *Paramecium* ein lineares Verhältnis zwischen Kompensation und Beschleunigung nachgewiesen werden kann, ist die Kompensationskurve bei *Stylonychia* zweigeteilt (*Paramecium*-Daten aus: Bräucker et al., 1994).

Oberflächen laufenden *Stylonychia mytilus* mit der des schwimmenden Ciliaten *Paramecium caudatum* verglichen.

Während *Paramecium* bei 1 g etwa 65% der Sedimentation kompensiert, kann *Stylonychia* durch die Gravikinese die Wirkung der Sedimentation vollständig aufheben. Die Kompensationskurve zeigt den auf Grund der Geschwindigkeitsdifferenzen zu erwartenden zweigeteilten Verlauf und ist nicht wie bei *Paramecium* linear. Im Bereich kleiner Beschleunigungen (bis 1,3 g) nimmt die Kompensationsfähigkeit von *Stylonychia* schnell ab, bleibt dann aber weitgehend gleich groß; bei 4 g werden noch 80% der Sedimentationsgeschwindigkeit kompensiert.

Neben der Gravikinese wurde die beschleunigungsabhängige Orientierung von *Stylonychia* untersucht. Abbildung 3.16 zeigt Polarhistogramme der Orientierung bei vier verschiedenen g-Stufen.

Die Präzision der Orientierung nimmt mit steigender Beschleunigungsstufe zu.

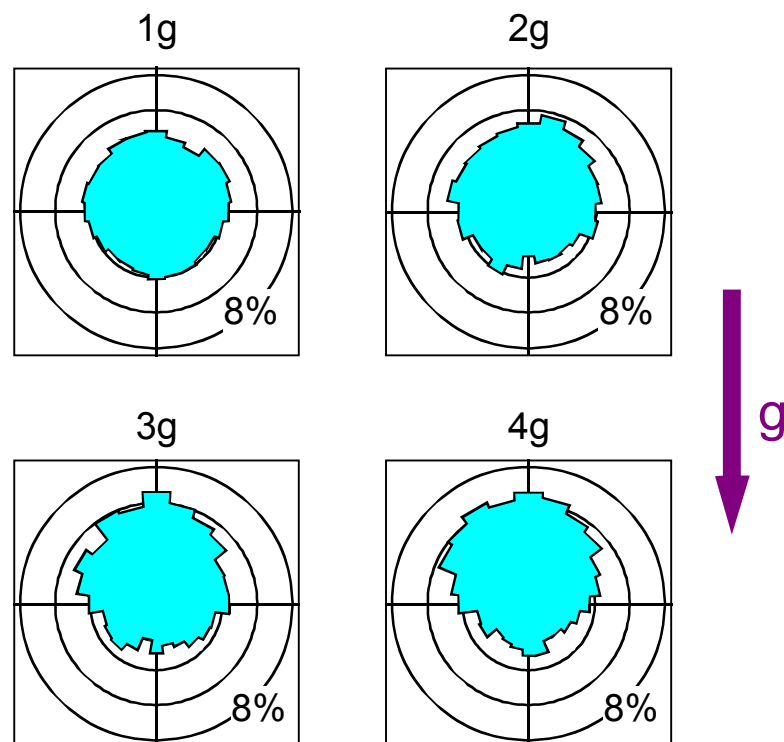


Abb. 3.16: Orientierungspolarogramme von *Stylonychia mytilus* bei verschiedenen Beschleunigungen. (15°-Sektoren, pro Diagramm mindestens 5000 Messungen).

Abbildung 3.17 zeigt, dass die Orientierungskoeffizienten linear von der Beschleunigung abhängen und bei 4 g noch keine Sättigung erreicht ist. Alle dargestellten Orientierungen sind signifikant.

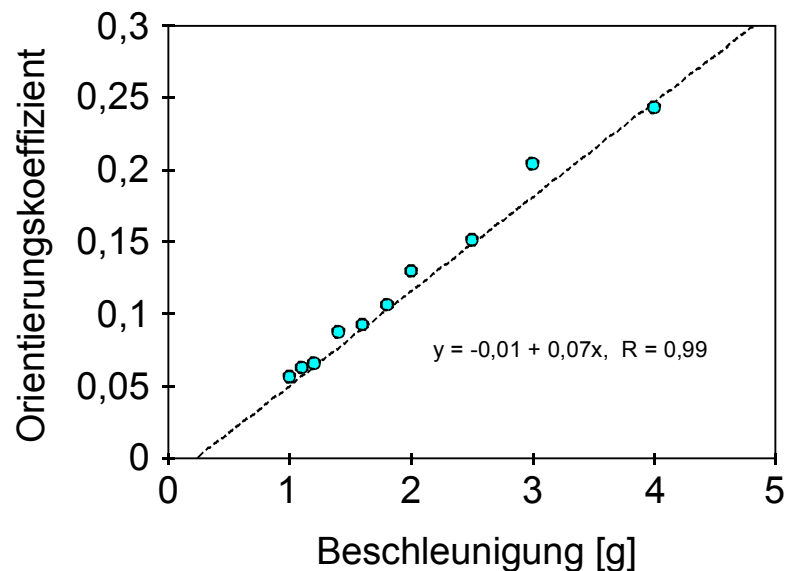


Abb. 3.17: Abhängigkeit der Orientierung von der Beschleunigung. Der Orientierungskoeffizient nimmt pro g-Stufe um 0,07 zu: Es besteht eine positive Korrelation zwischen Orientierung und Beschleunigung..

Erwartungsgemäß (keine Gravitaxis unter Bedingungen der Schwerelosigkeit) schneidet die Regressionsgerade die Ordinate etwa im Ursprung. Durch Extrapolation kann für 0 g ein Orientierungskoeffizient von -0,01 ermittelt werden, was einer zufälligen Orientierung der Zellpopulation entspricht.

3.2.6. Nachwirkungen erhöhter Beschleunigung

In einer zweiten Versuchsserie unter Hypergravitationsbedingungen wurde die Nachwirkung einer erhöhten Beschleunigung auf die Gravikinese und die Gravio-orientierung untersucht. Abbildung 3.18 zeigt die gemessenen Geschwindigkeitswerte vor, während und unmittelbar nach einer erhöhten Beschleunigung.

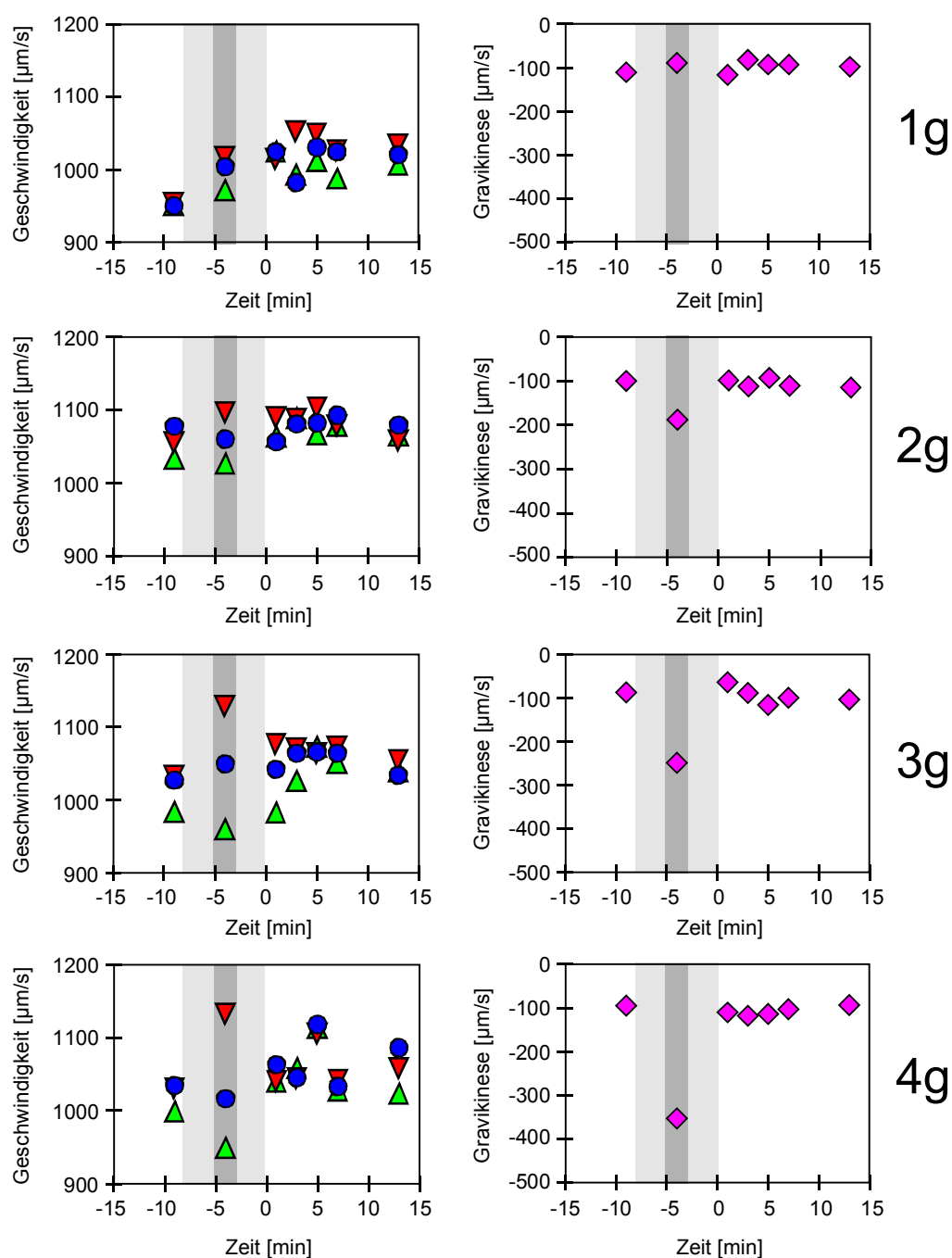


Abb. 3.18: Messungen der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten und der Gravikinesen nach Beschleunigungen von 1 g bis 4 g. Die Zellen wurden jeweils 2 Minuten den angegebenen Beschleunigungsstufen ausgesetzt. Der graue Balken bezeichnet den Zeitraum der Zentrifugation bzw. bei 1 g den gleichen Zeitraum bei stehender Zentrifuge (hellgrau: dreiminütige Beschleunigungs- und Abbremsphase der Zentrifuge; dunkelgrau: Phase konstanter Beschleunigung). Konfidenzbereiche wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen, waren jedoch in allen Fällen klein (pro Messpunkt durchschnittlich 700 Messwerte).

Der Zeitraum, in dem die Zellen einer erhöhten Beschleunigung ausgesetzt waren, betrug 8 Minuten (inklusive Beschleunigungs- und Abbremsphase der Zentrifuge von jeweils 3 Minuten Dauer). Mit steigender Beschleunigung wird die Differenz zwischen Abwärts- und Aufwärtslaufgeschwindigkeit und damit auch die Gravikinese größer. Nach dem Abbremsen der Zentrifuge ist kein nachhaltiger Effekt auf die Geschwindigkeiten und die Gravikinese zu beobachten. Lediglich bei 3 g ist in der ersten Aufnahme nach der Beschleunigungsphase eine erhöhte Geschwindigkeitsdifferenz zu erkennen.

Auch bei den Messungen der Zellorientierungen (Abb. 3.19) ist innerhalb der Messzeiträume kein nachhaltiger Effekt auf die Graviorientierung von *Stylonychia* zu beobachten.

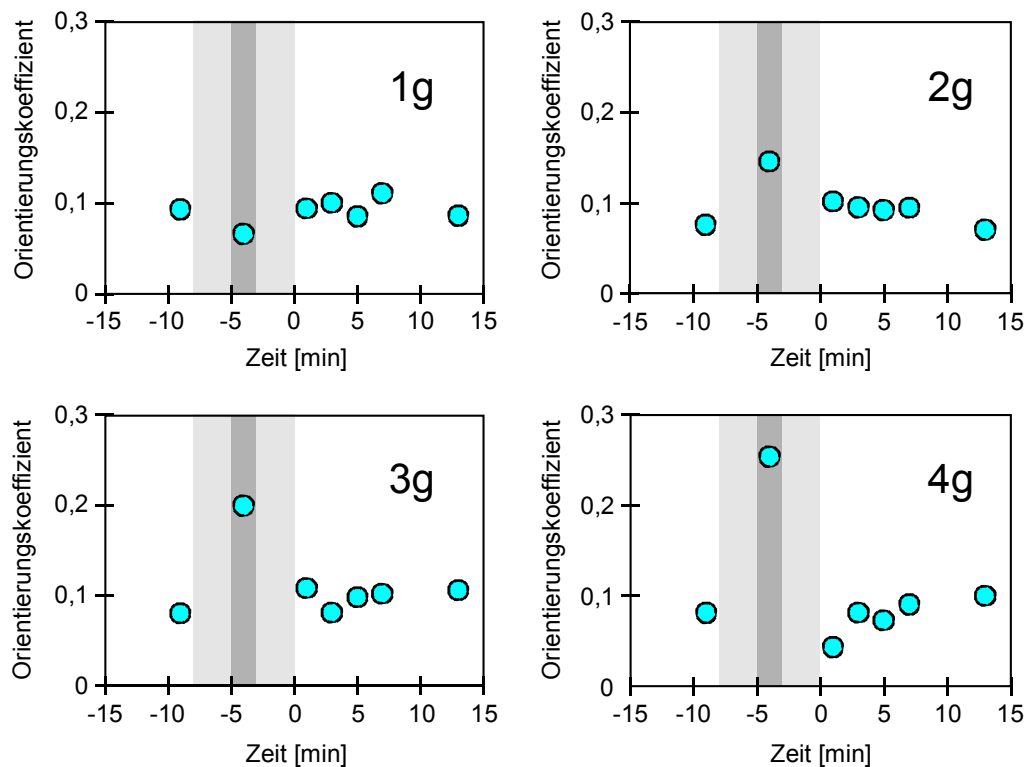


Abb. 3.19: Messungen zur Beeinflussung der Graviorientierung von *Stylonychia* durch eine erhöhte Beschleunigung (Drehung der Zentrifuge grau unterlegt, dunkelgrau die Phase konstanter Beschleunigung). Bei 1 g wurde der gleiche Messzeitraum ohne Drehen der Zentrifuge eingehalten. Alle Orientierungen sind signifikant (ca. 2900 Messungen pro Datenpunkt).

Die bei 2 g zu beobachtende leichte Relaxation der Orientierung nach dem Abbremsen der Zentrifuge ist statistisch nicht signifikant und kann auch durch die Daten der anderen Beschleunigungsstufen nicht bestätigt werden.

3.2.7. Versuche bei variierter Zentrifugalbeschleunigung

Stylonychia wurde in einer horizontal ausgerichteten Versuchskammer verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen im Bereich von 0 g bis 1,0 g ausgesetzt. Versuchszellen in horizontaler Versuchskammer zeigten weder eine bevorzugte Orientierung noch eine schwerkraftabhängige Modulation der Fortbewegungsgeschwindigkeit (3.2.4.). Durch die Einwirkung geringer Zentrifugalbeschleunigungen soll ein Verhalten induziert werden, das dem unter Hypogravitationsbedingungen ($a_r < 1$ g) entspricht.

In Abbildung 3.20 sind die gemessenen richtungsabhängigen Geschwindigkeiten dargestellt. Die Differenzen zwischen den Geschwindigkeiten zentrifugal (V_{D}) und zentripetal (V_{U}) laufender Zellen sind bei einer Zentrifugalbeschleunigung größer oder gleich 0,4 g signifikant. Die Geschwindigkeit zentrifugal laufender

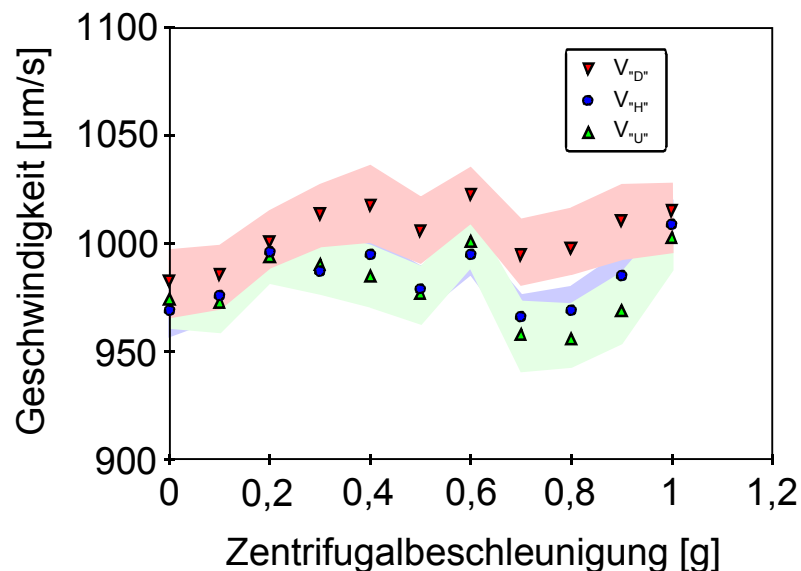


Abb. 3.20: Mediane Fortbewegungsgeschwindigkeiten bei Zentrifugalbeschleunigungen unterhalb von 1 g (90°-Sektoren, Konfidenzbereiche farbig unterlegt). V_{D} bezeichnet die Fortbewegung in zentrifugaler, V_{U} die Fortbewegung in zentripetaler Richtung. Alle Daten wurden in horizontal ausgerichteten Kammern erhoben (pro Datenpunkt etwa 3500 Messwerte).

Zellen nimmt mit steigender Zentrifugalbeschleunigung leicht zu, während die Geschwindigkeitsveränderung zentripetal und „horizontal“ laufender Zellen schwer zu beurteilen ist (die Geschwindigkeiten von Zellen in zentrifugaler bzw. zentripetaler Richtung werden mit V_{D} bzw. V_{U} bezeichnet).

Eine bessere Beurteilung der Geschwindigkeitsänderungen ist möglich, wenn die vermessenen Daten um die aus 3.2.1. abgeleiteten Sedimentationsgeschwindigkeiten korrigiert werden (Abb. 3.21). Ähnlich wie bei den Hypergravitationsversuchen (3.2.5.) wird so die aktive Geschwindigkeitsveränderung dargestellt.

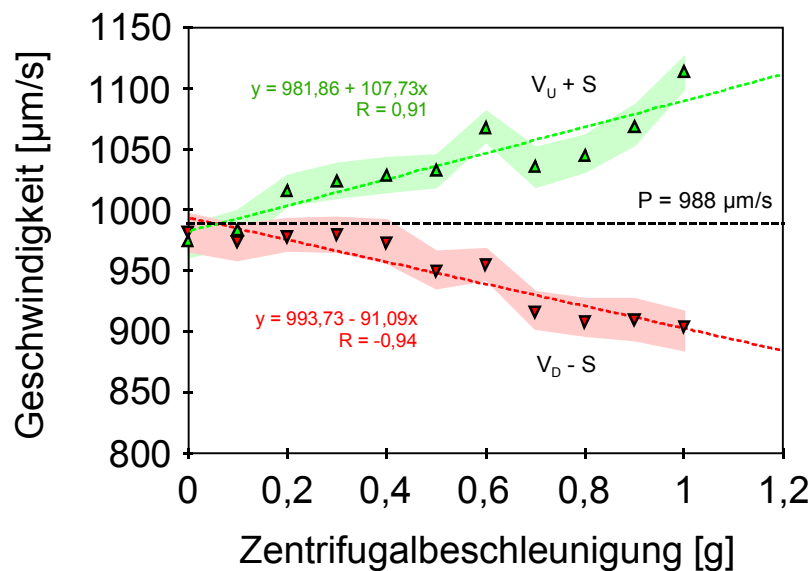


Abb. 3.21: Um die Sedimentationsgeschwindigkeit korrigierte Werte von V_{D} und V_{U} in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung. Die Konfidenzbereiche sind farbig unterlegt. Der P-Wert (988 $\mu\text{m/s}$) wurde aus dem Schnittpunkt der beiden Regressionsgeraden berechnet (pro Beschleunigungsstufe durchschnittlich 7000 Messdaten).

Die beiden Regressionsgeraden schneiden sich bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 0,05 g. Aus diesem Schnittpunkt lässt sich ein P-Wert von 988 $\mu\text{m/s}$ berechnen, der damit um 28 $\mu\text{m/s}$ niedriger ist als der P-Wert, der aus den Hypergravitationsdaten ermittelt wurde. Die um die Sedimentationsgeschwindigkeit korrigierten Geschwindigkeitsdaten lassen sich bei einer Zentrifugalbeschleuni-

gung von 0,1 g gerade noch statistisch trennen ($p < 5\%$). Dies könnte auf eine Schwelle für die Gravikinese zwischen 0 g und 0,1 g hindeuten.

Ähnlich wie bei den Hypergravitationsversuchen ist die Regressionsgerade für $V_{\text{U}} + S$ steiler als für $V_{\text{D}} - S$. Dies bedeutet, dass Δ_{U} stärker zur Modulation der Geschwindigkeit beiträgt als Δ_{D} .

Die Gravikinese zeigt in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung einen linearen Verlauf bis zur Nachweisgrenze (Abb. 3.22). Die Regressionsgerade schneidet die Ordinate bei einem Gravikinesewert von 5,9 $\mu\text{m/s}$. Diese Abweichung vom Ursprung ist statistisch nicht signifikant.

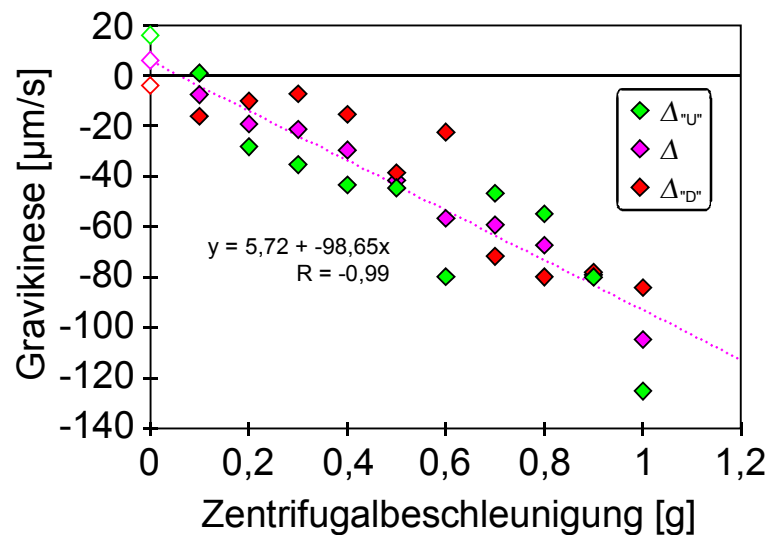


Abb. 3.22: Lineare Abhängigkeit der Gravikinese von der Zentrifugalbeschleunigung bis zur Nachweisgrenze von 0,1 g. Die Regressionsgerade bezieht sich auf die generalisierte Gravikinese (rosa Rauten). Δ_{U} ist die Gravikinese zentripetal laufender, Δ_{D} die der zentrifugal laufenden Zellen (Symbole s. Legende). Δ_{U} und Δ hängen linear von der Zentrifugalbeschleunigung ab, Δ_{D} ist bei Beschleunigungen $< 0,4$ g annähernd konstant.

Bei der Analyse der Zellorientierung (Abb. 3.23) konnte eine lineare Abhängigkeit des Orientierungskoeffizienten von der Zentrifugalbeschleunigung im Bereich von 0,4 g bis 1 g festgestellt werden. Unterhalb dieses Bereiches sind die ermittelten Orientierungen nicht mehr signifikant. Die Streuung der Orientie-

rungskoeffizienten ist höher als bei den Hypergravitationsversuchen, was auch der niedrigere Korrelationskoeffizient anzeigt.

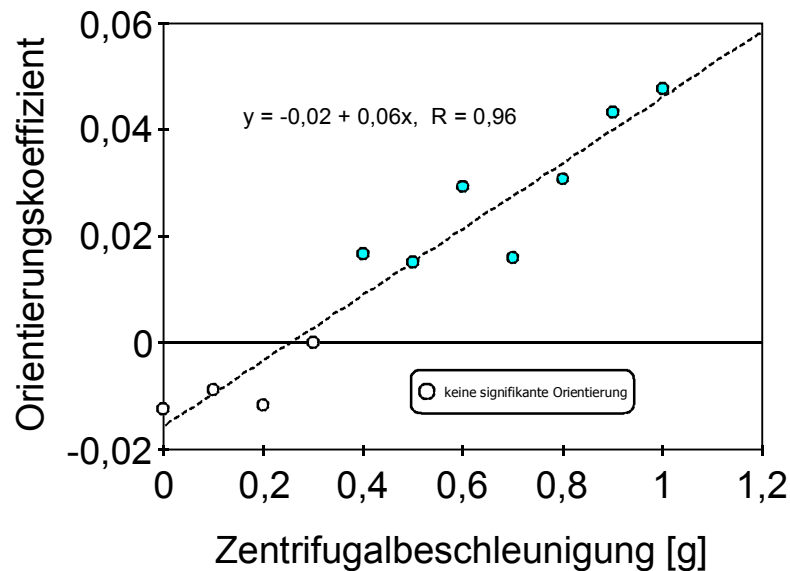


Abb. 3.23: Abhängigkeit des Orientierungskoeffizienten von der Zentrifugalbeschleunigung. Unterhalb von 0,4 g konnte mit dem Rayleigh-Test, trotz hoher Datenzahl, keine signifikante Orientierung mehr nachgewiesen werden.

3.2.8. Verhalten in Schwerelosigkeit

Durch die Versuche im Fallturm Bremen konnte das Verhalten von *Stylonychia mytilus* während des Stufenüberganges von 1 g zur Schwerelosigkeit beobachtet werden. In Abbildung 3.24 sind die relativen Häufigkeiten verschiedener Bewegungsmuster von *Stylonychia* in vertikaler und horizontaler Versuchskammer sowie unter Schwerelosigkeitsbedingungen dargestellt.

Ein Großteil der beobachteten Zellen bewegte sich auf Oberflächen laufend fort. Schwimmende Zellen sind selten (relative Häufigkeit unter 5%). Die Bewegungsmuster der Zellen sind unter Schwerelosigkeit (μg) ähnlich verteilt wie in horizontal gestellter Kammer. Die relative Häufigkeit der Zellen, die mindestens ein Reversal zeigten, erscheint bei vertikal gestellter Kammer höher als bei horizontal gestellter Kammer oder in Schwerelosigkeit.

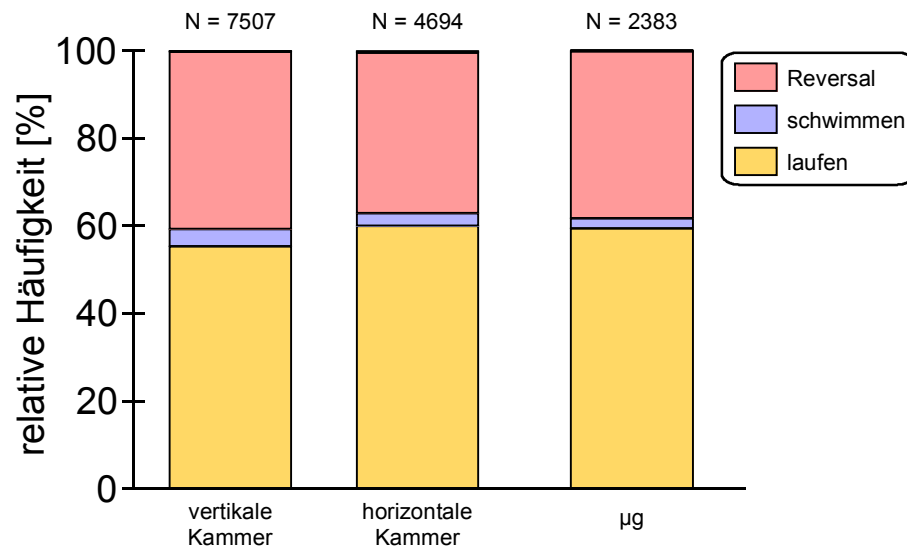


Abb. 3.24: Relative Häufigkeiten schwimmender und laufender Zellen sowie von Versuchszellen, die mindestens ein Reversal zeigten. In horizontaler Kammer und unter μg -Bedingungen ist der relative Anteil der laufenden Zellen höher als in vertikaler Kammer.

Mit Hilfe des Chi-Quadrattestes konnte jedoch nur ein signifikanter Unterschied zwischen den Reversalraten aus vertikaler und horizontaler Versuchskammer nachgewiesen werden ($p < 0,5\%$). Die Reversalraten der Zellen in horizontaler und vertikaler Versuchskammer änderten sich beim Übergang in die Schwerelosigkeit nicht signifikant (Abb. 3.25).

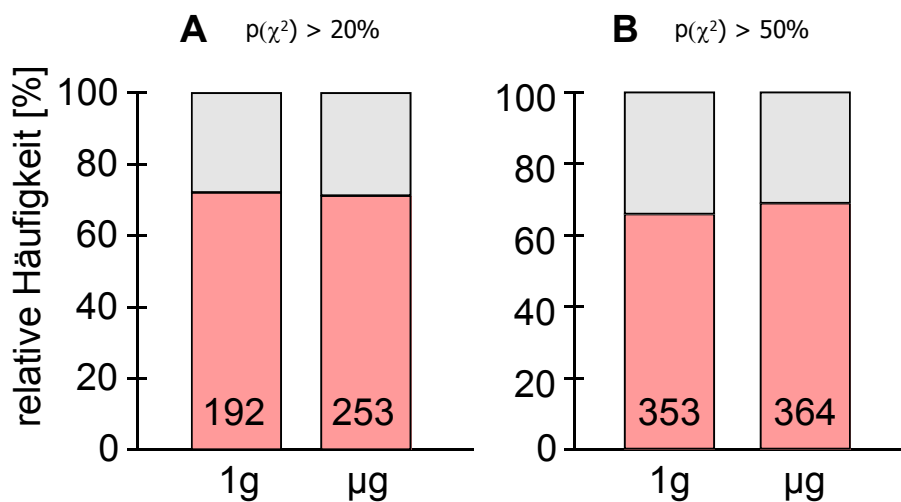


Abb. 3.25: Analyse der Reversalhäufigkeiten von Zellen in horizontaler (**A**) und vertikaler (**B**) Versuchskammer vor und nach dem Übergang in die Schwerelosigkeit. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Daten sind nicht mit den in Abb. 3.24 dargestellten Reversalhäufigkeiten vergleichbar, da jetzt nur die Zellen ausgewertet wurden, die ein Reversal zeigten. Datenzahlen im Balken angegeben.

Neben den Reversalraten wurde die Orientierung laufender und schwimmender Zellen vor und nach dem Übergang in die Schwerelosigkeit untersucht. Laufende Zellen zeigen bei 1 g eine deutliche negative Gravitaxis (Abb. 3.26). Der Orientierungskoeffizient ist mit 0,16 höher als in den anderen Versuchsreihen (vgl. 3.2.4.). Die Präzision der Orientierung nimmt während der Schwerelosigkeit ab. Der über die gesamte μg -Zeit gemittelte Orientierungskoeffizient beträgt 0,1. Mit dem Kuiper-Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Polarhistogrammen der Orientierung unter 1 g und μg nachgewiesen werden ($p < 0,5\%$).

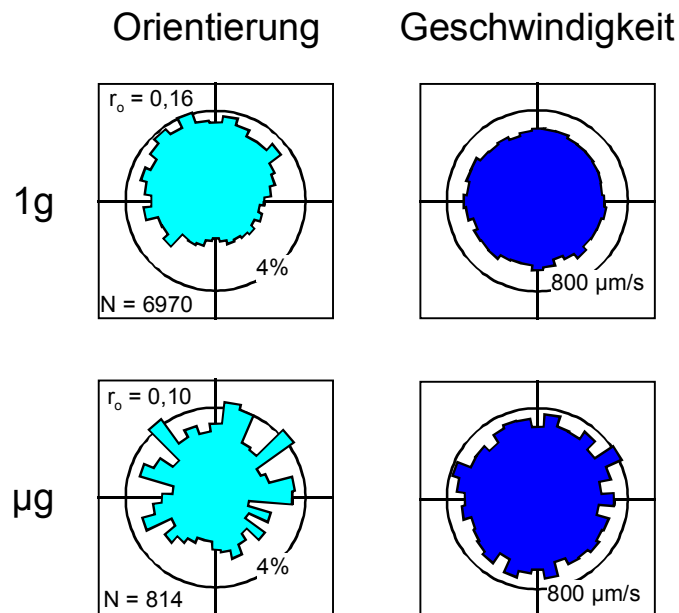


Abb. 3.26: Polarhistogramme der Orientierung und der Geschwindigkeiten laufender Zellen unter 1 g und Schwerelosigkeit (Datenzahlen wie angegeben). Die Signifikanz der Orientierungen wurde mit dem Rayleigh-Test nachgewiesen.

Anhand der Geschwindigkeitsverteilung ist keine Richtungsabhängigkeit der medianen Fortbewegungsgeschwindigkeiten unter 1 g und μg zu erkennen. Die Geschwindigkeiten während der Schwerelosigkeitsphase sind höher als unter 1 g.

Schwimmende *Stylonychia*-Zellen zeigen ebenfalls eine negative Gravitaxis (Abb. 3.27). Der Orientierungskoeffizient ist mit 0,38 signifikant höher als bei laufenden Zellen. Während der Schwerelosigkeitsphase nimmt die Präzision der Orientie-

rung ab. Der gemittelte Orientierungskoeffizient beträgt 0,14. Mit dem Rayleigh-Test konnte gezeigt werden, dass diese Orientierung jedoch nicht signifikant ist. Dies ist aber eher auf die geringe Anzahl von Messungen zurückzuführen. Die relativ niedrige Häufigkeit schwimmender Zellen und der kurze Messzeitraum (4,75 Sekunden μg) führen dazu, dass die Datenzahl während der μg -Phase sehr niedrig ist.

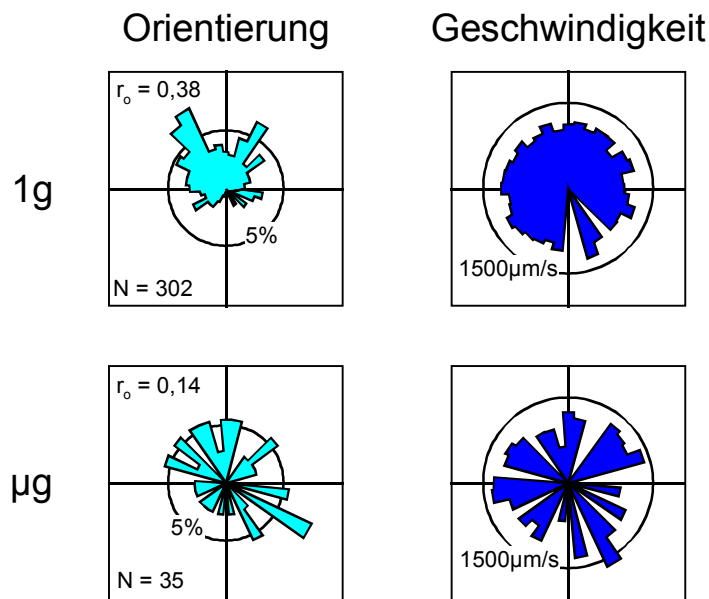


Abb. 3.27: Polarhistogramme der Orientierung und der Geschwindigkeit schwimmender Zellen. Die Orientierung der Zellen ist bei 1 g signifikant. Die Nichtbesetzung einzelner Sektoren ist auf geringe Datenzahlen zurückzuführen.

Die medianen Fortbewegungsgeschwindigkeiten schwimmender Zellen sind fast doppelt so hoch wie die von laufenden Zellen. Eine richtungsabhängige Veränderung der Geschwindigkeit ist jedoch auch bei schwimmenden Zellen nicht zu erkennen.

Für die weiterführenden Auswertungen der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten und der Relaxation der Gravikinese wurden, aus Gründen der Datenzahl, die erhobenen Messwerte laufender Zellen verwendet

Abbildung 3.28 zeigt die Veränderung der Geschwindigkeiten während des Überganges von 1 g nach μg . Der linke Teil der Abbildung entspricht den letzten fünf Sekunden vor dem Stufenübergang, der rechte Teil den 4,75 Sekunden des freien Falls der Versuchskapsel (μg). Der Wegfall der Sedimentationsgeschwindigkeit ist durch die Geschwindigkeitsabnahme der vormals abwärts orientierten Zellen um etwa $80 \mu\text{m/s}$ zu erkennen. Bei den zuvor aufwärts orientierten Zellen (V_U) setzt eine Zunahme der Geschwindigkeit (um etwa $50 \mu\text{m/s}$) zeitlich verzögert ein. Im weiteren Verlauf der μg -Phase nimmt die Geschwindigkeit vormals abwärts orientierter Zellen leicht zu, während die Geschwindigkeit vormals aufwärts orientierter Zellen relativ stark abnimmt. Gegen Ende des Messzeitraumes lassen sich die beiden Geschwindigkeiten statistisch nicht mehr voneinander trennen. Die Geschwindigkeit horizontal laufender Zellen unterliegt während der 1g-Phase relativ starken Schwankungen und nimmt während der μg -Phase leicht ab.

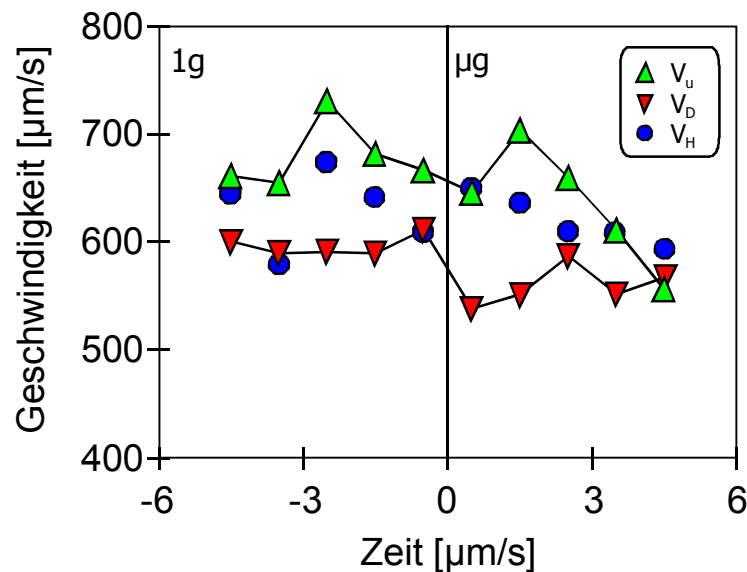


Abb. 3.28: Darstellung der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten vor und während der μg -Phase. Die Konfidenzbereiche werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die Geschwindigkeit vormals horizontal laufender Zellen (V_H) nimmt während der μg -Phase leicht ab. Zum Ende des Messzeitraumes hin fallen die Geschwindigkeiten vormals auf- und abwärtslaufender Zellen (V_U , V_D) zusammen.

Bei der Analyse der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten ist erkennbar, dass die Differenzen der Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeiten während der μg -Phase kleiner werden. Dieser Umstand wird durch die Berechnung der Gravikinesewerte noch deutlicher (Abb. 3.29). Während der 1g-Phase beträgt die Gravikinese im Durchschnitt etwa $-150 \mu\text{m/s}$. Damit wird die Sedimentationsgeschwindigkeit von $111 \mu\text{m/s}$ überkompensiert. Die plötzliche Zunahme der Gravikinese etwa 3 Sekunden vor dem Abwurf, ist auf eine nicht zu erklärende Zunahme der Geschwindigkeit aufwärtslaufender Zellen (vgl. Abb. 3.27) zurückzuführen.

Gemäß der speziellen Statocystenhypothese kann durch den Wegfall der Schwerkraft unter Schwerelosigkeitsbedingungen keine Gravikinese mehr ausgeprägt werden.

Die nach dem Übergang in die Schwerelosigkeit berechneten Gravikinesewerte (Abb. 3.29) sind Reste der Gravikinese, die unter normaler Schwerkraft ausgebildet wurde. Der Betrag dieser relaxierenden Gravikinese nimmt kontinuierlich ab und erreicht zum Ende der μg -Phase einen Wert von etwa $0 \mu\text{m/s}$.

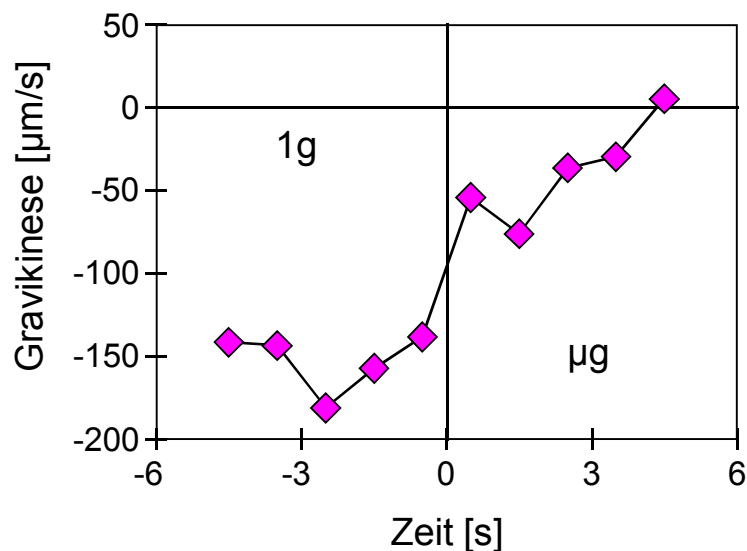


Abb. 3.29: Relaxation der Gravikinese nach dem Übergang in die Schwerelosigkeit. Der Betrag der Gravikinese nimmt während der μg -Phase ab und erreicht am Ende des Messzeitraumes einen Wert von etwa $0 \mu\text{m/s}$.

3.3. Elektrophysiologische Untersuchungen

In dem folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen an *Stylonychia mytilus* dargestellt. In einem ersten Schritt wurden die elektrischen Eigenschaften der Versuchszelle gemessen und mit den Daten früherer Messungen verglichen. In den weiterführenden Untersuchungen wurden erstmals die Mechanosensitivität der ventralen und dorsalen Membran untersucht und Gravirezeptorpotentiale abgeleitet.

3.3.1. Konstantstrominjektion

Stylonychia ist im Vergleich zu *Paramecium* eine relativ flache Zelle. Dies erfordert, dass die Elektroden in einem sehr flachen Winkel in die Zelle eingestochen werden müssen. Die Zelle sollte dabei frei von Nahrungsvakuolen sein, da sonst ein genaues Platzieren der Elektroden erschwert wird. Die Elektroden müssen, um einen festen Halt zu gewährleisten, entweder in den anterioren oder posterioren Nukleus eingestochen werden. Dabei ist es wichtig die Elektroden von der Ventralseite in die Zelle zu stechen, da sich die Zelle sonst trotz eingeführter Elektroden auf der Glas-Brücke fortbewegt. Probleme bei einigen Messungen ergaben sich dadurch, dass einige Zellen eine weiche Membran aufwiesen und keine hohen Stromstärken vertrugen. Auch die versuchsweise Verwendung von Kaliumcitrat als Elektrolyt der Stromelektrode brachte keine Abhilfe. Es ist zu vermuten, dass dieses Phänomen mit der Adaptation der Zellen zusammenhängt oder auch auf das relativ hohe Kulturalter (8 Jahre) zurückzuführen ist. Der Großteil der Messungen verlief jedoch problemlos.

Das mediane Ruhepotential der untersuchten Individuen von *Stylonychia mytilus* beträgt -44,34 mV (-0,74 mV / +1,06 mV, N=45 Zellen). Abbildung 3.30 zeigt eine Aufnahme des Membranpotentials über einen Zeitraum von 4,5 Sekunden. In regelmäßigen Abständen (mit einer Frequenz von etwa 1-2 Hz) werden spontane Aktionspotentiale ausgebildet.



Abb. 3.30: Ableitung des Membranpotentials (V_m) mit spontanen Aktionspotentialen (Dauer der Aufnahme: 4,5 Sekunden, dV/dt : erste zeitliche Ableitung des Membranpotentials).

Diese Aktionspotentiale entstehen durch eine hohe Fluktuation des Ruhepotentials, die zu einer Aktivierung niederschwelliger, spannungsabhängiger Calciumkanäle führt (de Peyer & Machemer, 1977). Das Membranpotential lässt sich durch die Injektion stufenförmiger Konstantstrompulse verändern (Abb. 3.31).

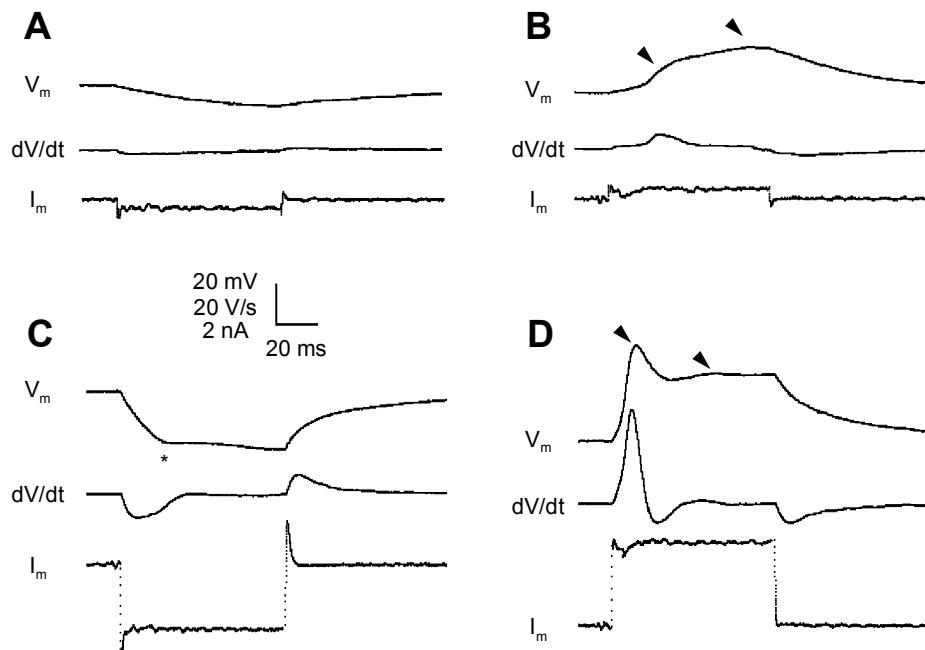


Abb. 3.31: Veränderung des Membranpotentials nach Injektion negativer (A, C) und positiver (B, D) Konstantstrompulse. Die Pulsdauer betrug 80 ms. Negative Strompulse führen zu einer Hyperpolarisation (A) und bei hohen Stromstärken zu einer Einwärtsgleichrichtung (C, Stern). Positive Strompulse führen zur Ausbildung eines zweiphasischen Aktionspotentials (Pfeile). V_m : Membranpotential, I_m : Stromspur, dV/dt : 1. Ableitung des Membranpotentials nach der Zeit.

Bei Injektion von niedrigen negativen Strompulsen (< 1 nA) verhält sich die hyperpolarisierte Membran wie ein passiver ohmscher Leiter. Stärkere Strompulse führen ab einer Amplitude von -2 nA zur Aktivierung spannungsabhängiger Kanäle (s. dV/dt -Spur, Abb. 3.31). Dabei handelt es sich um einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (de Peyer & Machemer, 1977).

Positive Strompulse führen zu einer Depolarisation der Membran und bereits bei einer Amplitude von $0,1$ nA zur Ausbildung von Aktionspotentialen. Das Aktionspotential von *Stylonychia* besteht aus zwei Komponenten. Eine schnelle, gradierte Komponente ist auf die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Cirrenmembran zurückzuführen. Diese Kanäle öffnen bei einer Depolarisation größer als 10 mV. Die bereits oben erwähnten, niederschwelligen Calciumkanäle sind auf den Membranellen lokalisiert und öffnen bei einer Depolarisation von > 3 mV. Die Öffnung dieser Kanäle führt zur Ausbildung einer langsamen Komponente des Aktionspotentials nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip (de Peyer & Machemer, 1977).

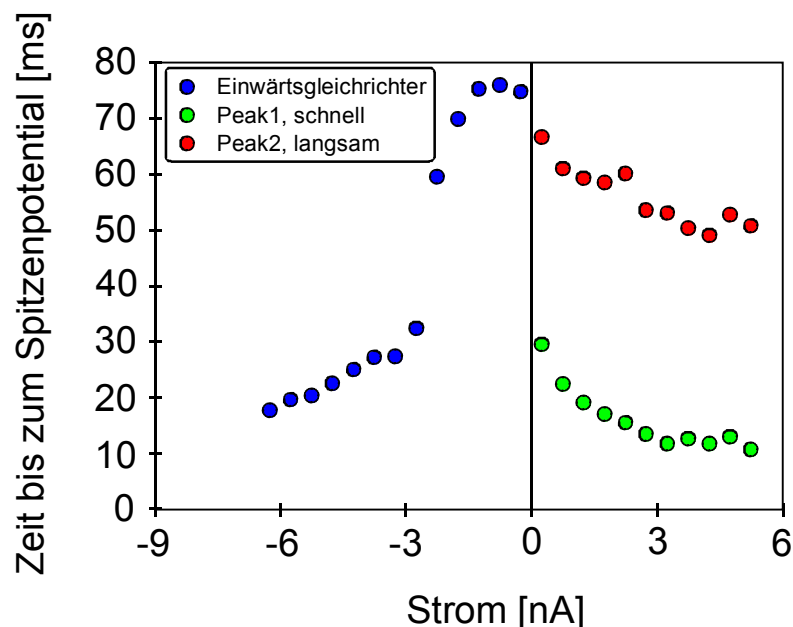


Abb. 3.32: Zeit bis zum Erreichen des Spitzenpotentials in Abhängigkeit von der Stromstärke (Peak1, Peak2: Komponenten des Aktionspotentials). Bei negativen Strompulsen (> -2 nA) werden einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle aktiviert.

In Abbildung 3.32 sind die Zeitintervalle zwischen Pulsbeginn und dem Erreichen des Spitzenpotentials in Abhängigkeit von der Stromstärke dargestellt („Time to peak“). Bei niedrigen Stromstärken (<1 nA) ist bereits deutlich ein Zeitunterschied von etwa 40 ms zwischen den beiden Komponenten des Aktionspotentials erkennbar. Oberhalb einer Stromstärke von 3 nA ist nach etwa 10 ms das Spitzenpotential der graduierten Komponente (Peak1) erreicht, das der Alles-oder-Nichts Komponente (Peak2) jedoch erst nach etwa 50 ms.

Um die Daten der Konstantstrominjektion statistisch auszuwerten, wurden die Potentialänderungen in Abhängigkeit von der injizierten Stromstärke ausgemessen. Dabei wurden jeweils die Amplituden der beiden Komponenten des Aktionspotentials sowie die Änderung des Membranpotentials 10 ms vor Pulsende („steady-state“) vermessen. Da sich die Stärke der injizierten Strompulse, bedingt durch die Bauweise der Versuchsanordnung, in den Einzelversuchen unterschieden, wurden Klassen mit einer Klassenbreite von 0,5 nA gebildet und die mediane Potentialänderung der einzelnen Klassen berechnet. Abbildung 3.33 zeigt eine Strom-Spannungsbeziehung für die späte Änderung des Membranpotentials („steady-

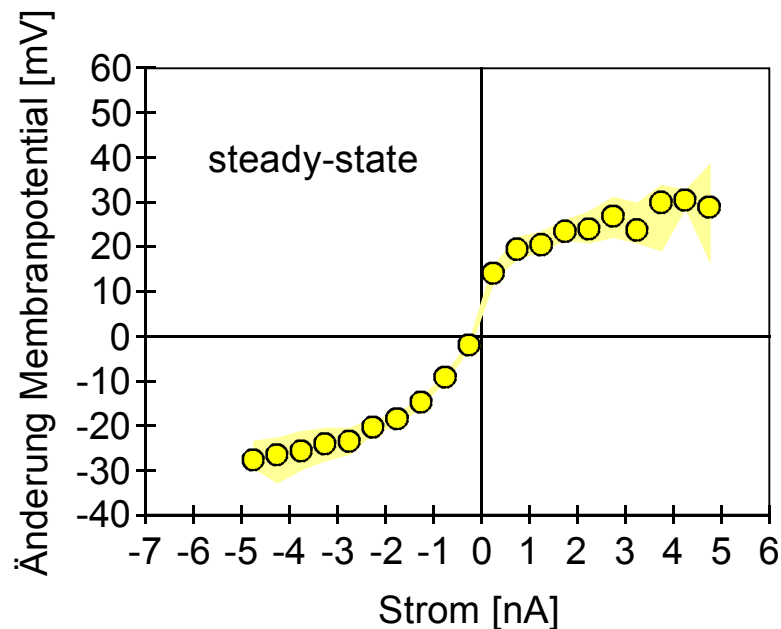


Abb. 3.33: Mediane, späte Potentialänderungen in Abhängigkeit von der Stromstärke (Konfidenzbereiche gelb unterlegt). Die Klassenbreite beträgt 0,5 nA. Gemessen wurde jeweils 10 ms vor Pulsende. Die Pulsdauer betrug 80 ms. Jeder Datenpunkt repräsentiert 10-166 Messungen von insgesamt 45 Zellen.

state“). Die Kurve hat einen sigmoidalen Verlauf, was auf eine aktive Änderung des Leitwertes der Membran als Folge der Konstantstrominjektion hindeutet.

In der Strom-Spannungsbeziehung in Abbildung 3.34 sind auf der Seite der positiven Strompulse die maximalen Potentialänderungen der gradierten Komponente des Aktionspotentials (Peak1) dargestellt. Bei Stromstärken größer 4 nA wurde eine maximale Potentialänderung von etwa 50 mV gemessen. Die Strom-Spannungskurve ist in diesem Bereich noch nicht gesättigt, so dass bei größerer Stromstärke noch höhere Spannungsamplituden zu erwarten wären. Im Bereich negativer Strompulse sind wieder die späten Potentialänderungen dargestellt.

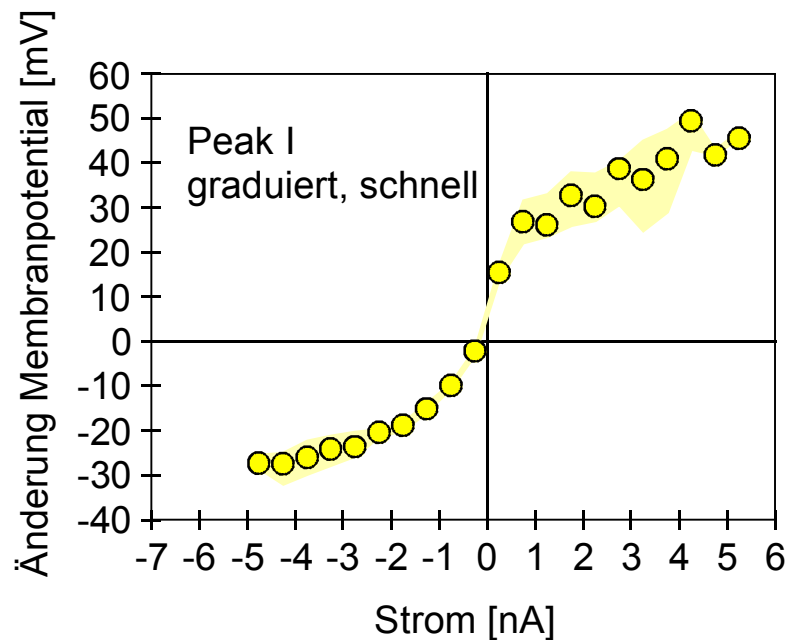


Abb. 3.34: Mediane Änderung des Membranpotentials nach Konstantstrominjektion (Konfidenzbereiche gelb unterlegt). Es wurde die maximale Amplitude des gradierten Aktionspotentials vermessen. Pro Datenpunkt 6-88 Messungen von 25 Zellen.

Die maximale Amplitude der langsamen Komponente des Aktionspotentials ist in Abbildung 3.35 dargestellt. Im Bereich negativer Strompulse wurde die maximale Änderung des Membranpotentials aufgetragen. Diese ist im Bereich hoher Strompulse auf die Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen zurückzufüh-

ren (Einwärtsgleichrichter, vgl. Abb. 3.31). Die maximale Amplitude des Alles-oder-Nichts Aktionspotentials ist um 30% kleiner als die des gradierten Aktionspotentials.

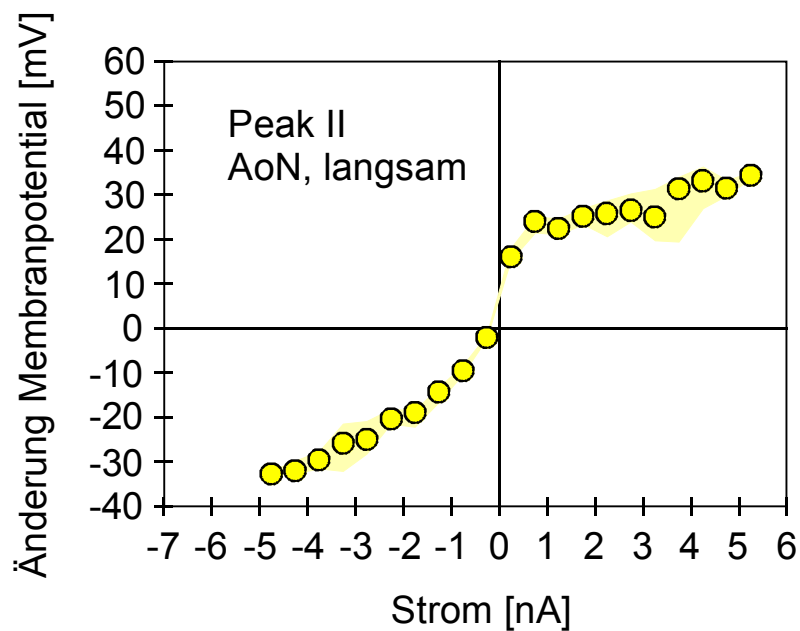


Abb. 3.35: Maximale mediane Änderung des Membranpotentials nach Konstantstrominjektion (Konfidenzbereiche gelb). Im Bereich positiver Strompulse wurde die maximale Amplitude des Alles-oder-Nichts Aktionspotentials (AoN) vermessen (pro Datenpunkt 9-92 Messungen von 23 Zellen).

3.3.2. Spannungsklemme

Bei den Untersuchungen in der Spannungsklemme wurde *Stylonychia*, ausgehend vom Haltepotential, mit stufenförmigen Spannungspulsen von 80 ms Dauer gereizt. Abbildung 3.36 zeigt typische Veränderungen des Transmembranstromes nach Gabe von positiven und negativen Spannungspulsen. Während im Bereich kleiner Hyperpolarisationen keine Veränderung des Membranstromes zu erkennen ist, führen Depolarisationen ab einer Amplitude von 3 mV zu frühen Einwärtsströmen. Dieser Strom ist auf die Öffnung spannungsabhängiger Calciumka-

näle zurückzuführen, deren Leitwertänderung auch für die Generierung des Aktionspotentials verantwortlich ist (Satow & Kung, 1979).

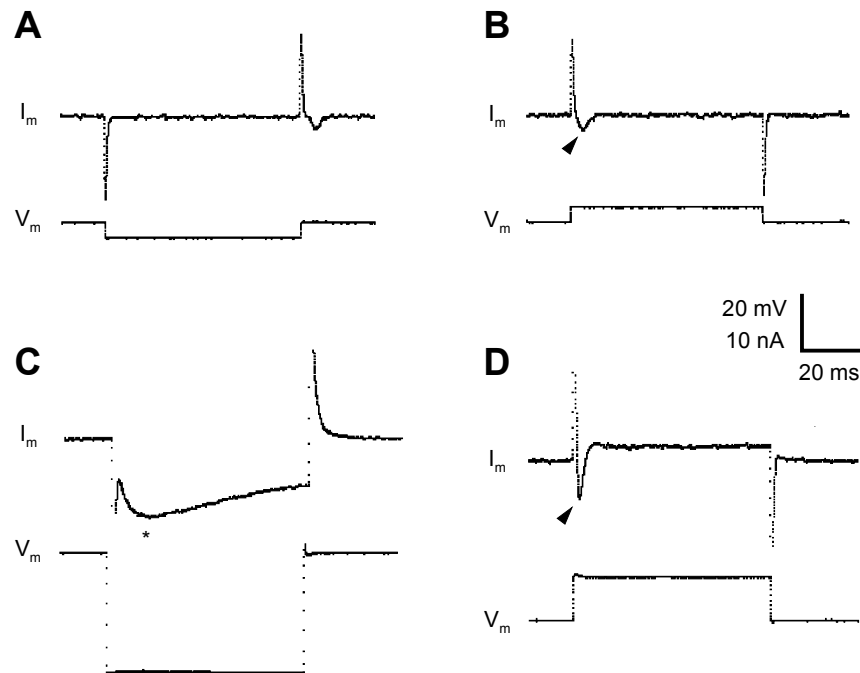


Abb. 3.36: Beispiele für Ableitungen in der Spannungsklemme. Ausgehend vom Haltepotential wurde die Zelle mit negativen (**A, C**) und positiven (**B, D**) Spannungspulsen (Pulsdauer 80 ms) gereizt. Die Pfeile markieren den frühen Einstrom nach einer Depolarisation der Membran. Starke Hyperpolarisationen (>30 mV) führen ebenfalls zu einwärts gerichteten Strömen (*). Alle Daten sind leakstromkorrigiert. V_m : Membranpotential, I_m : Stromspur.

Bei stärkeren Depolarisationen nimmt die Amplitude des Stromes graduert zu. Direkt nach dem frühen Einstrom kann ein schneller Auswärtsstrom gemessen werden (3.36.D). Dieser geht mit der Aktivierung der Kaliumkanäle einher, die für eine Repolarisierung sorgen und die gleichen Charakteristika aufweisen, wie frühe Kaliumionen-Ströme in Invertebraten-Neuronen („A-current“, Machemer & Deitmer, 1987). Starke Hyperpolarisationen führen zum Öffnen spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Kalium-Einwärtsgleichrichter) und spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Somamembran (vgl. 3.3.1.).

Abbildung 3.37 zeigt die relative Änderung des Membranstromes in Abhängigkeit von der angelegten Stufenspannung. Die Pulsdauer betrug 80 ms, gemessen wurde 10 ms vor Pulsende (späte Änderung des Stromes, „steady-state“). Es wurden Spannungspulse unterschiedlicher Amplitude zu Klassen mit einer Klassenbreite von 5 mV zusammengefasst und die mediane Änderung des Membranstromes jeder Klasse berechnet. In einem Bereich von -20 mV unterhalb bis +25 mV oberhalb des Ruhepotentials ist keine aktive Leitwertänderung zu erkennen. Hyperpolarisationen um mehr als 25 mV führen zu einer Einwärtsgleichrichtung, während eine Auswärtsgleichrichtung ab einer Depolarisation um 40 mV zu messen ist.

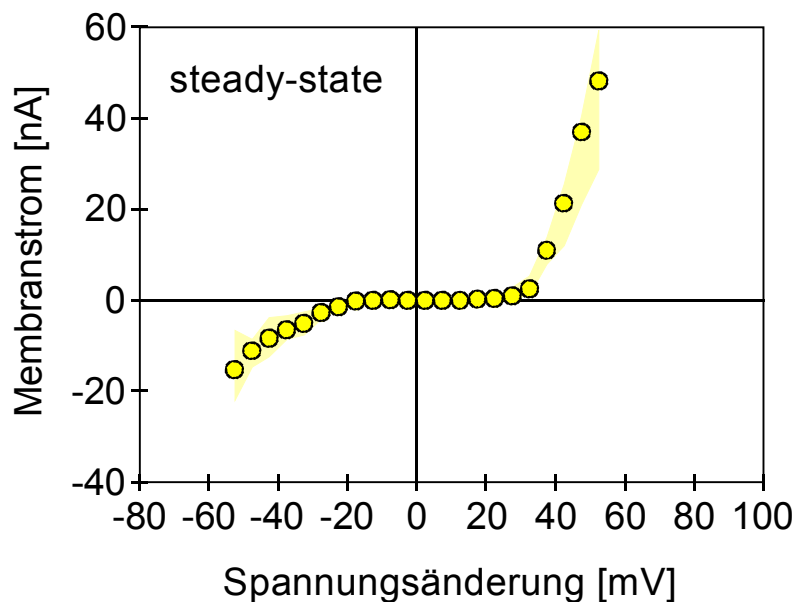


Abb. 3.37: Mediane Änderung des Membranstromes 10 ms vor Pulsende (Konfidenzbereiche gelb unterlegt). Alle Daten wurden leakstromkorrigiert. Die Klassenbreite betrug 5 mV (pro Datenpunkt 14-166 Messungen von 35 Zellen).

Abbildung 3.38 stellt die relative Änderung des frühen Transmembranstromes dar. Ausgemessen wurde jeweils die auf eine Depolarisation folgende maximale Amplitude des frühen Einstromes. Im Bereich der Hyperpolarisationen wurden die maximalen Ströme zu Beginn der Spannungsstufe ausgemessen.

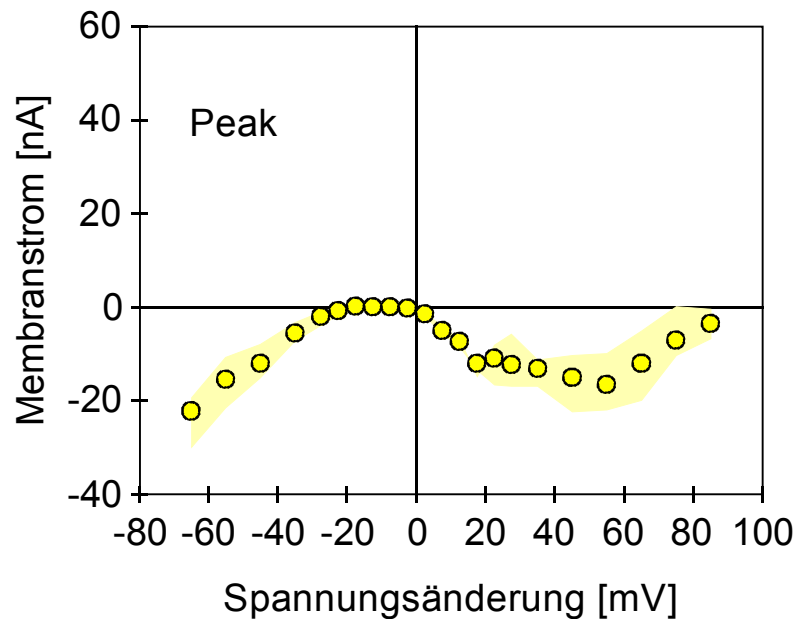


Abb. 3.38: Mediane Änderung des frühen Transmembranstromes bei stufenförmigen Spannungspulsen (Konfidenzbereiche gelb unterlegt). Die Pulsdauer betrug 80 ms. Alle Daten wurden leckstromkorrigiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert 10-148 Messungen aus 28 Zellen. Die Klassenbreite beträgt 5 mV (im Bereich -25 mV bis +25 mV) bzw. 10 mV.

Bei einer Depolarisation um 55 mV wurden maximale Einwärtsströme mit einer Amplitude von -17 nA gemessen. Das Umkehrpotential ist bei einer Spannungstufe von +90 mV zu erwarten. Im Bereich positiver Spannungsstufen verändert sich die Steigung der Kurve bei einer Depolarisation um 20 mV. Hier werden die Calciumkanäle aktiviert, deren Öffnung für die gradierte Komponente des Aktionspotentials verantwortlich ist.

3.3.3. Membraneigenschaften von *Stylonychia mytilus*

Bei der Injektion kleiner negativer Konstantstrompulse findet noch keine aktive Leitwertänderung der Membran statt (3.3.1.). Die Strom-Spannungs-Kennlinie entspricht in diesem Bereich der eines ohmschen Leiters. Anhand der Spannungsänderungen in diesem Bereich ist es möglich, Aussagen über elektrophysiologische Eigenschaften der passiven Membran zu machen. Tabelle 3.9 stellt die gemessenen und berechneten Parameter dar.

Tab. 3.9: Elektrophysiologische Eigenschaften der Zellmembran von *Stylonychia mytilus*. In die Werte des spezifischen Membranwiderstandes und der spezifischen Membrankapazität gingen die in 3.1. berechneten Werte der Zelloberfläche mit ein.

Membranpotential	-44,34 mV (-0,74 / +1,06 mV)	N = 812 Messungen
Eingangswiderstand R_E	21,28 M Ω (-5,18 / +2,22 M Ω)	N = 70 Messungen
Zeitkonstante τ	38,87 ms (-2,42 / +1,91 ms)	N = 56 Messungen
Eingangskapazität C_E	1,82 nF	$C_E = \tau / R_E$
spez. Membranwiderstand	42,5 k Ω cm ²	mit 200118,1 μ m ²
spez. Membrankapazität	0,91 μ F/cm ²	mit 200118,1 μ m ²

Die Zeitkonstante τ beschreibt die Zeit, die beim Umladen der Membrankapazität notwendig ist, um 63% ($=1-1/e$) des maximalen Spannungswertes zu erreichen. Ihr Wert hängt neben der Eingangskapazität auch vom Eingangswiderstand ab, und lässt sich nach Formel I.c berechnen. Bei der Berechnung des spezifischen Membranwiderstandes und der spezifischen Membrankapazität wurde die in 3.1. berechnete Gesamtfläche der Zellmembran zu Grunde gelegt.

3.3.4. Mechanosensitivität

In Abbildung 3.39 sind Beispiele für Veränderungen des Membranpotentials nach einer mechanischen Reizung dorsaler, ventraler und lateraler Membranbereiche dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die bipolare Verteilung der mechanosensitiven Kanäle für die gesamte Zelloberfläche besteht.

Eine mechanische Reizung der Zelle am Vorderende führt zu Depolarisationen und auf Grund der niedrigen Schwelle zur Ausbildung graduierter Aktionspotentiale. Die Amplitude der Depolarisation nimmt ab, je weiter der Stimulator nach posterior verschoben wird.

Stimulationen in Höhe der pulsierenden Vakuole (Zellmitte) führen zu keiner Änderung des Membranpotentials, da sich hier depolarisierende und hyperpolarisierende

rende Rezeptorpotentiale aufheben. Die stärksten Hyperpolarisationen werden am posterioren Zellpol gemessen.

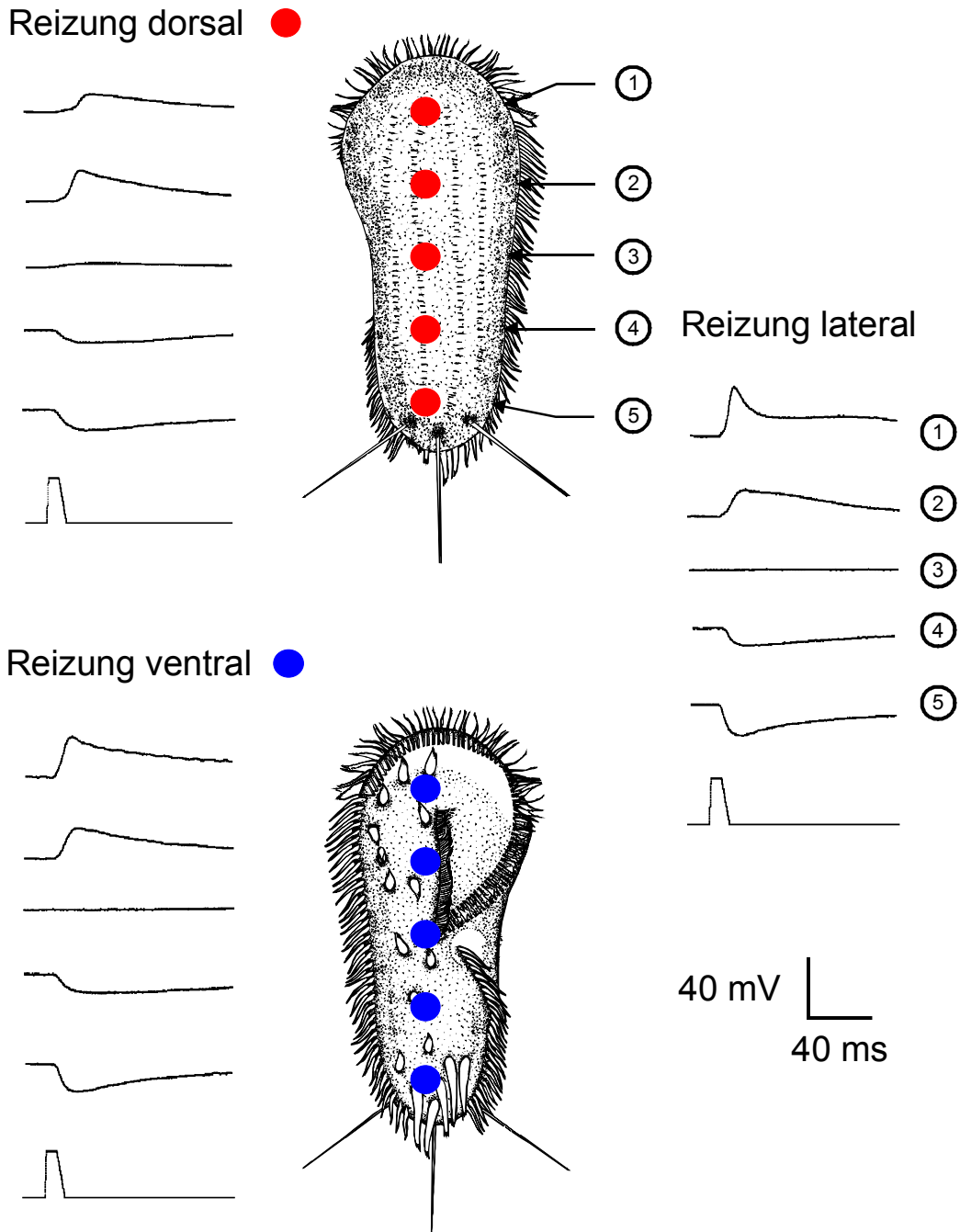


Abb. 3.39: Beispiele für Änderungen des Membranpotentials nach mechanischer Reizung dorsaler, ventraler und lateraler Membranbereiche. Die bipolare Verteilung der Mechanorezeptoren erstreckt sich offenbar über die gesamte Zelloberfläche. Dargestellt sind jeweils die aufgezeichneten Membranpotentialspuren. Der trapezförmige Puls kennzeichnet den Zeitpunkt der Reizung. Ein Unterschied zwischen linker und rechter Zellseite konnte nicht nachgewiesen werden.

Zur quantitativen Auswertung der Potentialänderungen wurden die Versuchszellen entlang der Zelllängsachse in fünf gleichgroße Sektoren eingeteilt. Die mechanischen Reizungen und die dazugehörigen Potentialänderungen wurden je nach Reizort einem dieser Sektoren zugeordnet. Anschließend wurde der Median aller Potentialänderungen innerhalb eines Sektors berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.40 dargestellt. Auf der Abszisse ist als Maß für den Reizort die relative Entfernung zum posterioren Zellpol aufgetragen.

Die stärksten Änderungen des Membranpotentials konnten bei einer Reizung der Lateralseiten gemessen werden. Hier ergaben sich am anterioren Zellpol maximale Amplituden von +42 mV. Durch die mechanische Reizung wurde hier in fast allen Fällen ein Aktionspotential mit deutlich ausgeprägter graduierter Komponente ausgelöst. Am posterioren Zellpol betrug die maximale Änderung des Membranpotentials -35 mV.

Bei einer Stimulation der Dorsalseite betrug die maximale Potentialänderung am Vorderende der Zelle +22 mV und am Hinterende -20 mV. Stärkere Depolarisationen konnten in einem Bereich mehr zur Zellmitte hin (Sektor 2 vom anterioren Zellpol aus gesehen) gemessen werden.

Die Änderung des Membranpotentials auf der Ventralseite waren höher als auf der Dorsalseite. Statistisch konnte kein Unterschied zwischen den Spannungsänderungen bei einer Stimulation der linken und der rechten Lateralseite nachgewiesen werden.

Ebenso sowenig bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Potentialänderungen nach Reizung der linken oder rechten Ventral- bzw. Dorsalseite innerhalb eines Sektors. Aus diesem Grunde wurden die Daten für die statistische Auswertung zusammengefasst. Potentialänderungen bei einer Reizung der rechten, anterioren Ventralseite (von ventral aus gesehen) zeigten, dass die Mechano-sensitivität der Zelle nicht an die direkte Umgebung von Cilien oder Cirren gekoppelt ist.

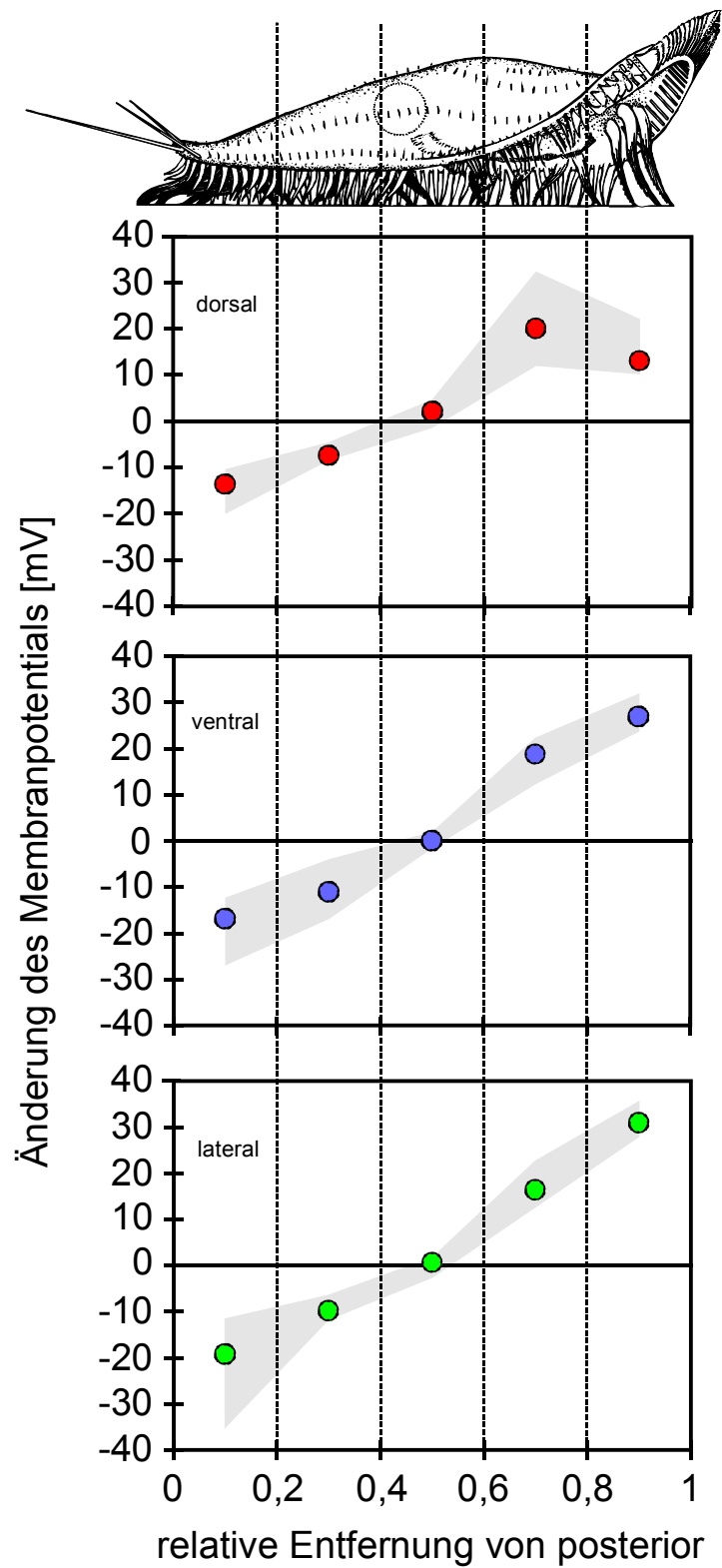


Abb. 3.40: Mediane Änderung des Membranpotentials nach mechanischer Reizung von dorsalen, ventralen und lateralen Membranbereichen (Konfidenzbereiche: grau, pro Datenpunkt mindestens 4 Zellen)

Eine Mechanostimulation im mittleren Sektor führte bei dorsaler Reizung zu einer leichten Depolarisation der Membran (+2,1 mV), während bei ventraler und lateraler Reizung keine Veränderung des Membranpotentials gemessen werden konnte. *Stylonychia* ist offenbar auf der Dorsalseite mechanisch unempfindlicher als auf der Ventralseite. Die höchsten Potentialänderungen werden durch eine laterale Stimulation induziert.

Die Latenzzeit zwischen dem ersten Kontakt des Stimulators mit der Membran und dem Beginn der Potentialänderung betrug sowohl am posterioren Zellende wie auch am anterioren Zellpol bei allen untersuchten Zellen 3-4 ms.

Bei vier Zellen wurde eine mechanische Reizung der Ventralseite in der Spannungsklemme durchgeführt. Eine Stimulation des anterioren Zellpols führte zu Einwärtsströmen mit einer mittleren Amplitude von 13,5 nA, während eine Reizung des posterioren Zellpols zu Auswärtsströmen mit einer mittleren Amplitude von 19,6 nA führten.

3.3.5. Gravirezeptorpotentiale

Als Gravirezeptorpotentiale gelten die Membranpotentialänderungen, die durch das postulierte schwerkraftabhängige Öffnen der mechanosensitiven Kanäle induziert werden. Die an *Stylonychia* durchgeführten Untersuchungen zur Messung von Gravirezeptorpotentialen gestalteten sich teilweise als schwierig. Anders als bei Versuchen mit Elektroden, die von ventral eingestochen werden, kann die Platzierung lateral eingeführter Elektroden nach dem Herausziehen der Haltekapillare nicht mehr korrigiert werden. Um mechanische Stimulationen durch die Elektroden zu minimieren, wurden diese im mittleren Zellbereich in den langgestreckten Nukleus eingeführt. Die Manipulation der Zellposition erfolgte besonders vorsichtig, um Verletzungen und ein seitliches Wegdrehen zu verhindern. Eine selbständige Drehung der Zelle war ausgeschlossen, da die Cirren während des Ruhepotentials inaktiv waren oder durch leichte Fluktuationen des Membranpotentials unkoordiniert schlugen. Für das seitliche Einstechen der Elektroden

in den Nukleus gab es kein Widerlager. Um dennoch einen festen Sitz der Elektroden zu garantieren, wurde der Impedanzwandler kurzzeitig leicht überkompensiert, was zu einer hochfrequenten Schwingung der Elektroden spitze führte. Eine Verletzung der Zellen wurde durch diese Prozedur nicht beobachtet. Eine gleichzeitiges Einführen sowohl der Stromelektrode als auch der intrazellulären Spannungselektrode in den gleichen Zellkern war nur in seltenen Fällen möglich. In einigen Fällen zeigte die Zelle hochfrequente Aktionspotentialfolgen. Diese Zellen wurden von der Auswertung ausgenommen.

Auf die Blockierung der niederschwelligen, spannungsabhängigen Calciumkanäle mit Concanavalin A (Ivens & Deitmer, 1986) und der damit einhergehenden Verminderung spontaner Aktionspotentiale wurde verzichtet, da nicht klar ist, welchen Effekt dieser Blocker auf die Gravirezeptorkanäle hat.

Stylonychia zeigt eine relativ starke Fluktuation des Membranpotentials. Um diese Schwankungen nicht zu verstärken, ist auf eine gute Abschirmung des Versuchstandes geachtet worden. Auf die gemessenen Potentialänderungen hat das Rauschen des Membranpotentials keinen Einfluss, da die Fluktuation nicht von der Orientierung der Zelle beeinflusst wird. Pro Zelle konnten im Durchschnitt 4 Drehungen durchgeführt werden. Oft lösten sich die Zellen von den Elektroden oder die Elektroden verstopften bzw. rutschen aus dem Zellkern heraus.

In die Auswertungen wurden nur die Zellen aufgenommen, die vor der Drehung keine Potentialänderung zeigten, um zu verhindern, dass eine „Abdrift“ des Membranpotentials die gemessenen Potentialänderungen verfälscht.

Die Messung von Gravirezeptorpotentialen ist, wie bereits beschrieben, nur möglich, wenn das Membranpotential über einen längeren Zeitraum (>60 s) stabil abgeleitet werden kann. Ein zu hohes „Rauschen“ oder ein auf Elektrodenartefakte zurückzuführende „Abdrift“ des Potentials würde die durch die Schwerkraftwirkung hervorgebrachten Potentiale möglicherweise überdecken. Aus diesem Grund

wurden zunächst Langzeitaufnahmen des Membranpotentials, ohne Drehung der Versuchszelle, durchgeführt.

Abbildung 3.41 zeigt die Ableitung des Membranpotentials über einen Zeitraum von 120 Sekunden. Die Zelle war während der gesamten Messung mit der Längsachse horizontal und mit der Ventralseite zum Boden des Bades ausgerichtet. Die Standardabweichung vom mittleren Membranpotential betrug $\pm 0,8$ mV.



Abb. 3.41: Ableitung des Membranpotentials über 120 Sekunden. Die intrazellulären Elektroden wurden lateral in den hinteren Nukleus gestochen. Die Zelle ist während der Messung horizontal, d.h. mit der Ventralseite nach unten, ausgerichtet. Das Membranpotential ist über den gesamten Messzeitraum konstant (Standardabweichung vom mittleren Ruhepotential: $\pm 0,8$ mV)

Ausgehend von dieser Lage wurde die Zelle mit Hilfe der Mikromanipulatoren in unterschiedliche Positionen gedreht, während gleichzeitig das Membranpotential gemessen wurde. Im Folgenden werden für jede Ausrichtung der Zelle typische Aufnahmen des Membranpotentials und statistische Auswertungen der Potentialänderungen aller Versuchszellen gezeigt. Der Zeitraum der Drehung wurde durch die Aufnahme eines Triggersignals (2.4.7.) gekennzeichnet. Für jede Aufzeichnung wurde über den Zeitraum vor der Drehung der Median des Membranpotentials bestimmt. Dieser wurde von allen Messpunkten während und nach der Drehung abgezogen. Dieser Bezug auf ein „Ruhepotential“ war notwendig, da sich die individuellen Potentiale der Versuchszellen deutlich unterschieden. Für die statistische Auswertung wurde der gesamte Messzeitraum in Klassen mit einer Breite von 5 s eingeteilt. Für jede Klasse wurde der Median der Potentialabweichung bestimmt und dieser gegen die Zeit aufgetragen.

In die Auswertung gingen nur solche Zellen ein, deren medianes Membranpotential sich während des Zeitraumes vor der Drehung nicht veränderte. Bei etwa 10% der Zellen führte die Ausrichtung mit dem Vorderende nach unten zu zahlreichen Aktionspotentialen. Diese Zellen wurden von der Medianbildung ebenso ausgeschlossen, wie Zellen, die bereits vor der Drehung Aktionspotentiale ausbildeten.

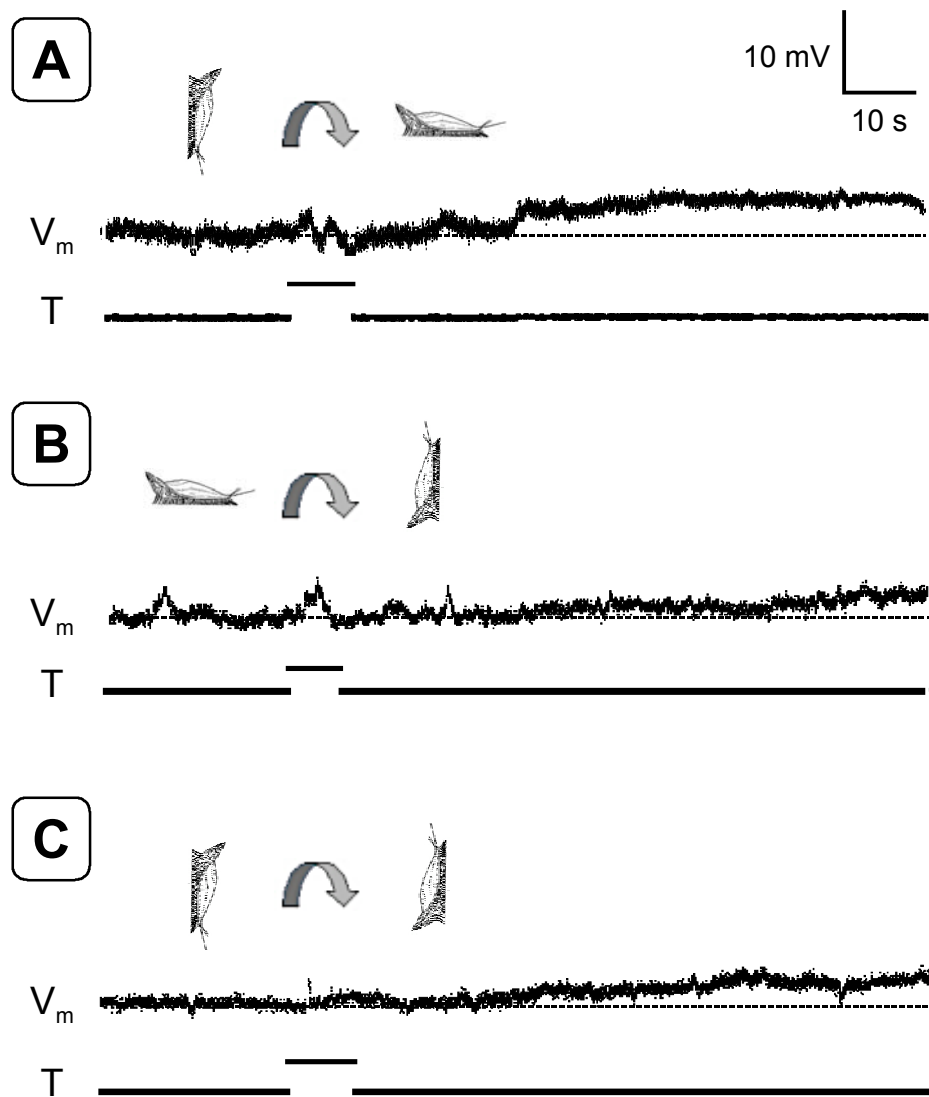


Abb. 3.42: Verschiedene Beispiele für Drehungen, die zu einer Depolarisation der Zellen führen (gezeigt sind typische Änderungen des Membranpotentials, V_m). Der Pfeil und die Triggerspur (T) geben den Zeitpunkt der Drehung an. Die Zellsymbole verdeutlichen die Art der Drehung: (A) Drehung um 90° von „posterior unten“ nach „horizontal“, (B) Drehung um 90° von „horizontal“ nach „anterior unten“, (C) Drehung um 180° von „posterior unten“ nach „anterior unten“. Bei den Potentialänderungen handelt es sich sehr wahrscheinlich um Gravirezeptorpotentiale, die auf die Aktivierung von Mechanorezeptorkanälen im anterioren Zellbereich bzw. auf die Inaktivierung von posterioren Mechanorezeptorkanälen zurückzuführen sind (Skala gilt für alle Spuren).

Abbildung 3.42 zeigt Beispiele für Drehungen, die zu einer Depolarisation der Versuchszellen führen. Eine Drehung der Zelle von „posterior unten“ nach „horizontal“ (Abb. 3.42, A) führt zu einer Depolarisation, da in der horizontalen Lage der Zelle zusätzlich Kanäle am anterioren Zellpol gereizt werden und weniger Kanäle am posterioren Zellpol. Nach einer Drehung der Zelle von „horizontal“ nach „anterior unten“ werden durch die Kraft des Cytoplasmas ausschließlich Kanäle im anterioren Zellbereich gereizt, was ebenfalls zu einer Depolarisation führt (Abb. 3.42, B). Bei einer Drehung der Versuchszelle um 180° von „posterior unten“ nach „anterior unten“ ist zu erwarten, dass sich die durch die beiden Mechanorezeptor-Populationen induzierten Änderungen des Membranpotentials addieren. Vor der Drehung wurden die Versuchszellen für mindestens zwei Minuten in der Ausgangslage belassen.

Dass es sich bei den gezeigten Änderungen des Membranpotentials höchstwahrscheinlich um Gravirezeptorpotentiale handelt, wird durch die statistische Auswertung mehrerer Versuche deutlich (Abb. 3.43). Dargestellt sind jeweils die medianen Änderungen des Membranpotentials nach Drehungen, die zu einer Depolarisation führen. Dabei wird deutlich, dass die Änderung des Membranpotentials relativ langsam erfolgt (0,03 mV pro Sekunde). Die statistische Auswertung ergibt bei einer Drehung von „posterior unten“ nach „horizontal“, anders als bei den anderen Versuchsdurchführungen, keine stetige Veränderung des Membranpotentials. Es sind zwei Depolarisationen erkennbar, eine 40 Sekunden und eine weitere 80 Sekunden nach der Drehung. Die maximale mediane Änderung des Membranpotentials ist mit einem Betrag von 3,9 mV höher als bei der Drehung von „horizontal“ nach „anterior unten“.

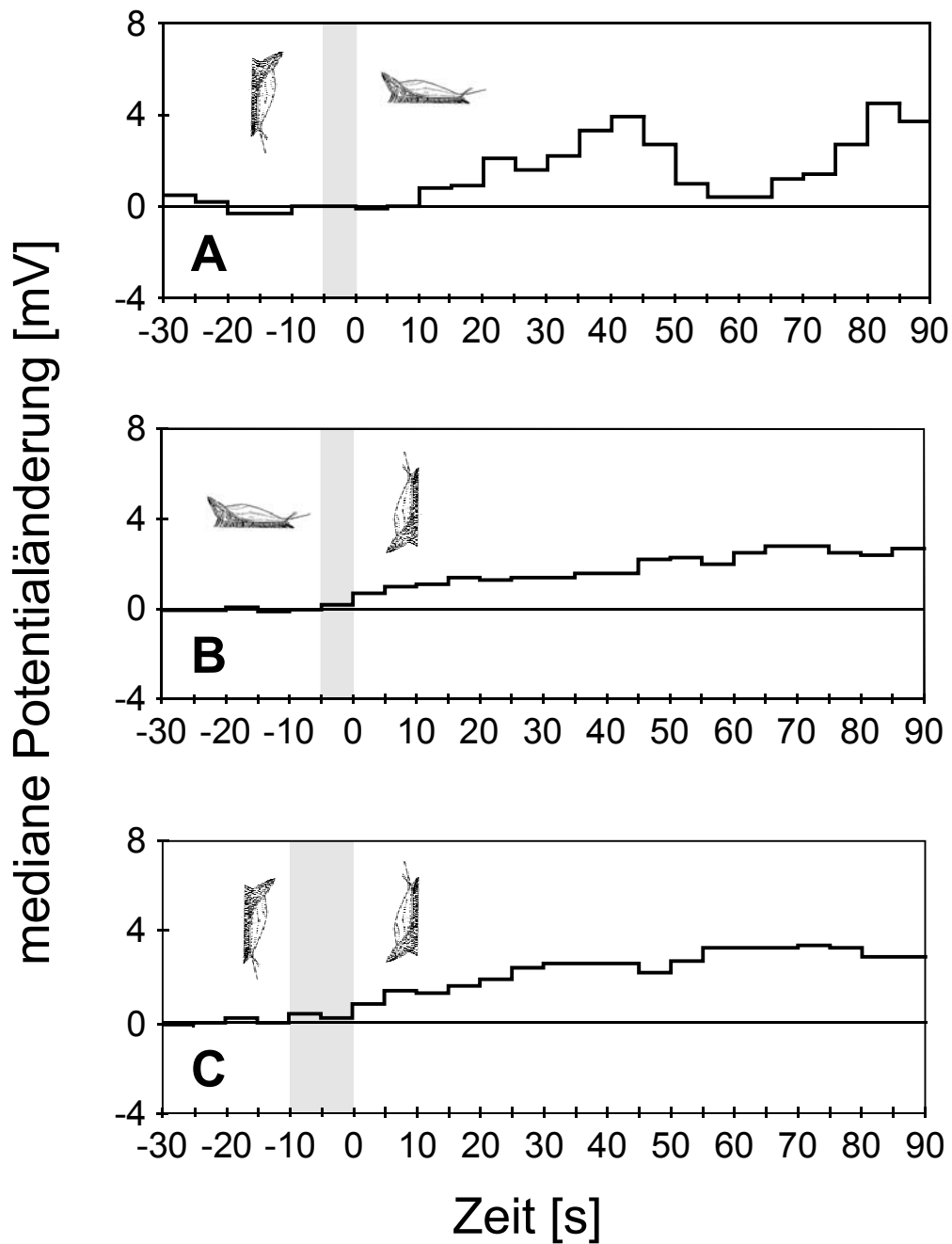


Abb. 3.43: Statistische Auswertung der Versuche, bei denen eine Drehung der Versuchszelle zu einer Depolarisation führt (Art der Drehungen wie in Abb. 3.42). Die Phase der Drehung ist jeweils grau unterlegt (Datenzahlen bei (A): 9 Messungen von 7 Zellen, (B):47 Messungen von 30 Zellen, (C):17 Messungen von 12 Zellen.). Die medianen Potentialänderungen am Ende der Drehung sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Gemäß der speziellen Statocystenhypothese führt eine Aktivierung der mechanosensitiven Kanäle am posterioren Zellpol zu einer Hyperpolarisation der Zelle. In Abbildung 3.44 sind die Drehungen dargestellt, die eine derartige Hyperpolarisation induzieren. Dabei handelt es sich um Drehungen der Zelle von „anterior unten“ nach „horizontal“ (A), von „horizontal“ nach „posterior unten“ (B) und von „anterior unten“ nach „posterior unten“ (C). Da die Kraft des Cytoplasmas, die auf den anterioren Membranbereich einwirkt durch diese Drehungen geringer wird, trägt die Inaktivierung der Kanäle in diesem Bereich zur Hyperpolarisation bei.

Die statistische Auswertung (Abb. 3.45) zeigt eine stetige Veränderung des Membranpotentials mit einer ähnlich niedrigen Zeitkonstanten, wie bei den depolarisierenden Gravirezeptorpotentialen. Weder bei den depolarisierenden noch bei den hyperpolarisierenden Rezeptorpotentialen kann mit Sicherheit gesagt werden, ob das Membranpotential am Ende des Messzeitraumes konstant bleibt. Bei einer Drehung von „horizontal“ nach „anterior unten“ (Abb. 3.43, B) scheint dies nicht der Fall zu sein. Bei einer Drehung von „horizontal“ nach „posterior unten“ ist bis etwa 55 Sekunden nach der Drehung eine stetige Hyperpolarisation der Zelle zu erkennen (Abb. 3.45, B), die dann zum Ende der Messung hin etwas geringer ausfällt (-2 mV).

In Tabelle 3.10 sind die maximalen medianen Änderungen des Membranpotentials nach unterschiedlicher Ausrichtung der Zelle zusammengefasst.

Tab. 3.10: Maximale mediane Änderung des Membranpotentials (ΔV_m) in Abhängigkeit von der Ausrichtung der Versuchszelle

Ausgangslage	Drehrichtung	ΔV_m
horizontal	posterior unten	-2,9 mV
posterior unten	Horizontal	+3,9 mV
horizontal	anterior unten	+2,7 mV
anterior unten	horizontal	-3 mV
posterior unten	anterior unten	+3,4 mV
anterior unten	posterior unten	-4 mV

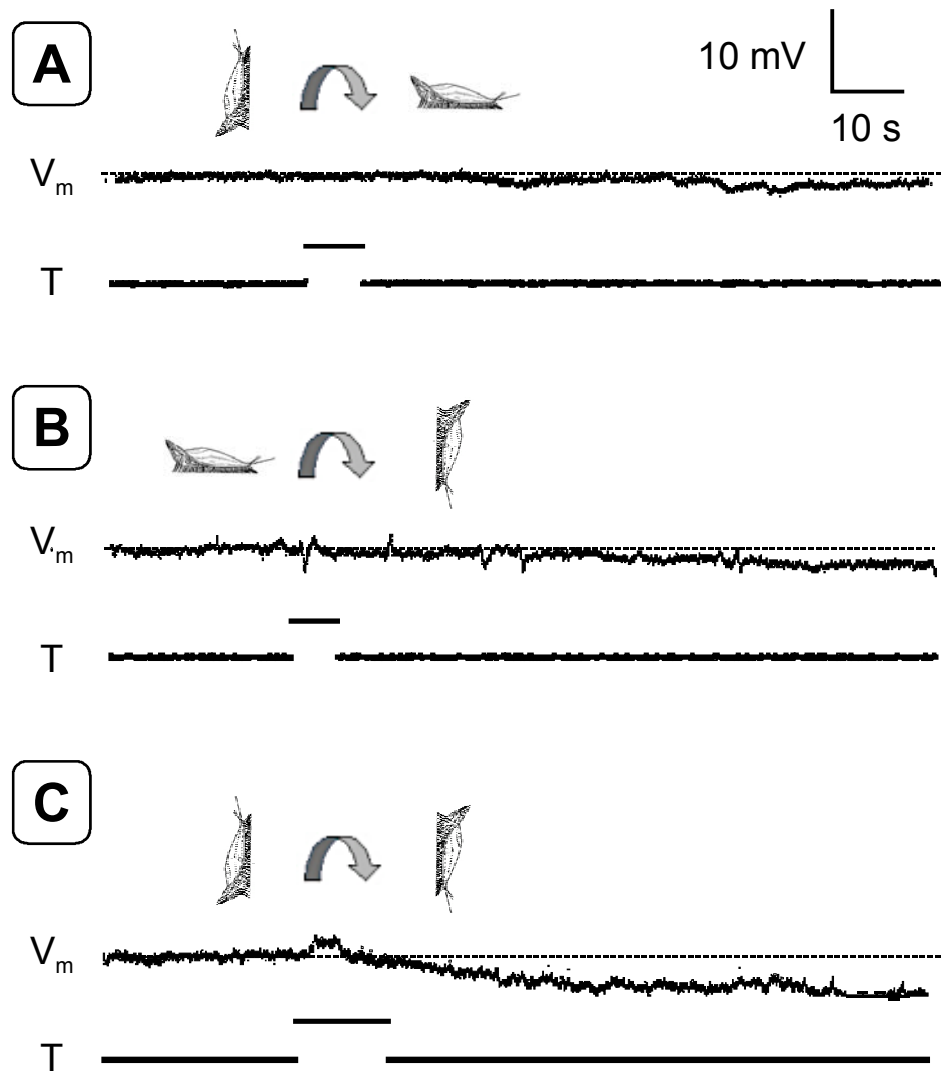


Abb. 3.44: Typische Membranpotentialableitungen (V_m) vor und nach Drehungen der Versuchszellen, die zu einer Hyperpolarisation führen. Der Zeitpunkt der Drehung wird jeweils durch den Pfeil und die Triggerspur (T) angezeigt. Die Zellsymbole verdeutlichen die Art der Drehung: (A) Drehung um 90° von „anterior unten“ nach „horizontal“, (B) Drehung um 90° von „horizontal“ nach „posterior unten“, (C) Drehung um 180° von „anterior unten“ nach „posterior unten“. Die gezeigten Änderungen des Membranpotentials werden höchstwahrscheinlich durch die Aktivierung von mechanosensitiven Rezeptorkanälen im posterioren Zellbereich induziert. Die Inaktivierung anteriorer Kanäle wirkt dabei unterstützend (Skala gilt für alle Spuren).

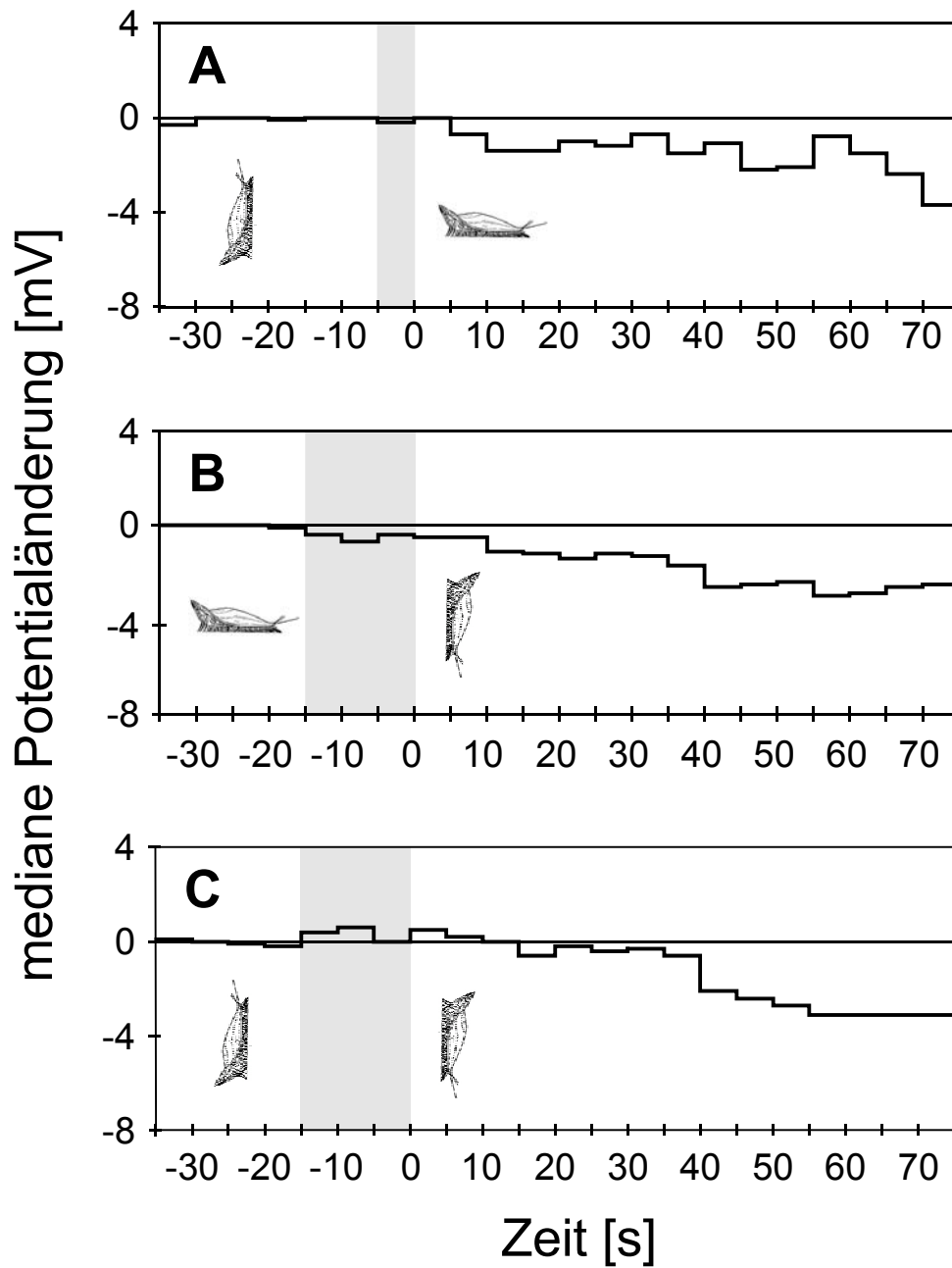


Abb. 3.45: Mediane Änderungen des Membranpotentials vor und nach Drehungen, die zu einer Hyperpolarisation der Versuchszellen führen (Art der Drehungen wie in Abb. 3.44). Die Phase der Drehung ist jeweils grau unterlegt (Datenzahlen bei **(A)**: 14 Messungen von 14 Zellen, **(B)**: 32 Messungen von 21 Zellen, **(C)**: 22 Messungen von 12 Zellen.). In allen drei Fällen ist eine stetige Veränderung des Membranpotentials zu erkennen. Die maximalen, durch die Drehung induzierten, Potentialänderungen sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Ein Drehen der Versuchszelle bei gleichzeitiger Spannungsklemme ist prinzipiell möglich. Allerdings ist die aus der Drehung resultierende Amplitude des Transmembranstromes so niedrig, dass das Signal im Rauschen untergeht. Zwei Messungen in der Spannungsklemme zeigten keine Änderung des über die Membran fließenden Stromes. Die Kalibrierung des Oszilloskopes muss für Messungen in der Spannungsklemme auf Grund des hohen Rauschens der Stromspur auf 10 nA/Segment eingestellt werden. Durch Abschätzungen mit Hilfe der gemessenen Potentialänderungen und des Eingangswiderstandes der Zelle liegen die zu erwartenden Stromamplituden wahrscheinlich unterhalb von 0,2 nA.

Über eine mögliche Photosensitivität von *Stylonychia* sind in der Literatur keine Daten bekannt. Alle Messungen wurden daher vorsichtshalber bei der niedrigstmöglichen Lichtintensität ($0,5 \text{ W/m}^2$) durchgeführt, so dass die jeweilige Versuchszelle gerade noch erkennbar war. Um dennoch einen Einfluss der Mikroskopbeleuchtung auf die gemessenen Potentialänderung abschätzen zu können, wurden Langzeitmessungen des Membranpotentials durchgeführt, in deren Verlauf die Mikroskopbeleuchtung auf die höchstmögliche Lichtintensität geschaltet wurde (von $0,5 \text{ W/m}^2$ auf 10 W/m^2). Direkt nach dem Lichtreiz konnte eine phasische Depolarisation der Zelle um etwa 2 mV gemessen werden (Abb. 3.46).

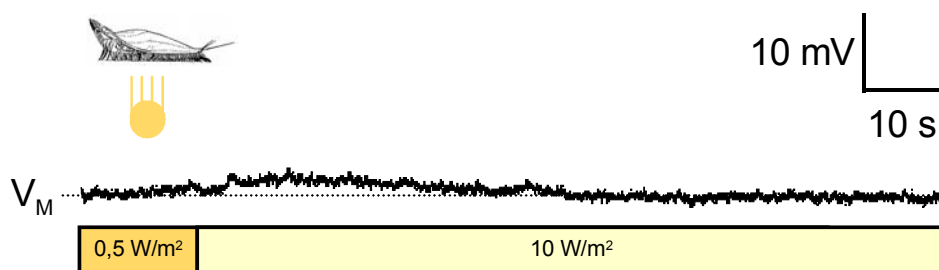


Abb. 3.46: Veränderung des Membranpotentials (V_M) nach einer Erhöhung der Lichtintensität durch die Mikroskopbeleuchtung von $0,5 \text{ W/m}^2$ auf 10 W/m^2 (gelber Balken). Die Zelle war während des gesamten Messzeitraumes horizontal ausgerichtet, die Beleuchtung wirkte von ventral auf die Zelle ein. Es wurde eine phasische Veränderung des Membranpotentials um 2 mV gemessen.

4. Diskussion

In dem folgenden Kapitel werden zunächst die Daten der verhaltensphysiologischen Untersuchungen zur Schwerkraftwahrnehmung von *Stylonychia mytilus* diskutiert. Bei einer mikroskopischen Beobachtung einer auf einem Deckglas laufenden Zelle ist zu erkennen, dass die ventralen Cirrengruppen direkten Kontakt mit der Glasoberfläche haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit erstmalig die Schwerkraftwahrnehmung eines auf Oberflächen *laufenden* Ciliaten untersucht. Bei *Loxodes striatus*, dessen Gravitaxis ebenfalls ausführlich untersucht worden ist (Hemmersbach et al., 1996; Neugebauer et al., 1998), sind zwar Gleitbewegungen beobachtet worden, ob die Cilien dabei Kontakt mit dem Substrat haben ist allerdings fraglich: Es ist denkbar, dass *Loxodes* auf einem Wasserfilm gleitet. Die Unterschiede im schwerkraftabhängigen Verhalten zwischen *Loxodes* und *Stylonychia* sind zu diskutieren. Darüber hinaus sollen die Fragen beantwortet werden, ob sich die Graviperzeption von *Stylonychia* von der schwimmender Ciliaten (z.B. *Paramecium*) unterscheidet und ob die „spezialisierte“ Statocystenhypothese (Machemer et al., 1991) auch auf „laufende“ Zellen zu übertragen ist.

4.1. Verhaltensanalyse von *Stylonychia*

Die bei anderen Ciliaten etablierten Methoden der Verhaltensanalyse (Machemer & Bräucker, 1992) lassen sich auch bei *Stylonychia mytilus* anwenden. Die Zellen vertragen das Einfüllen in die Versuchskammern gut und zeigen keine längerfristige Verhaltensänderung gegenüber den Zellen in der Kultur. Wird für die Abdichtung der Versuchskammer ein anderes Material als Silikon (z.B. Tygon) verwendet, ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen drastisch reduziert (<4 Stunden). Dies ist wohl auf einen vergleichsweise hohen Sauerstoffbedarf der Zellen (2,3 nl O₂ pro Stunde und Zelle; Foissner et al., 1991) zurückzuführen. *Stylonychia* zeigt nach dem Einfüllen in die Kammern verschiedene Verhaltensmuster (Abb. 3.24). Ein Großteil der Population befindet sich auf der Kammer-

oberfläche und führt Laufbewegungen aus. Ein sehr geringer Anteil der Zellen schwimmt.

Um die geeigneten Versuchsbedingungen für die Verhaltensanalyse zu definieren, wurden Adaptationsversuche durchgeführt. Dazu wurde das Verhalten der Versuchszellen in verschiedenen Versuchslösungen über mehrere Stunden untersucht. Durch diese Experimente konnte der Anteil der sich bewegungslos auf der Kameroberfläche aufhaltenden Zellen bestimmt werden. Dieses Verhalten wird im Folgenden als Inaktivität bezeichnet und ist darauf zurückzuführen, dass die ventralen Cirrenguppen, die hauptsächlich zu einer Bewegung der Zelle beitragen, keine Schlagbewegungen durchführen. Das deutet daraufhin, dass das Membranpotential inaktiver Zellen keine Abweichung vom Ruhepotential zeigt (1.2.2.). Das schwerkraftabhängige Verhalten von *Stylonychia* kann jedoch nur an aktiven, d.h. sich bewegenden Zellen, untersucht werden. Dass diese Zellen eine Vorwärtsbewegung durchführen, ist auf eine hyperpolarisationsabhängige Cirrenaktivität zurückzuführen (Abb. 1.1), das Membranpotential dieser Zellen ist also in negative Richtung verschoben. Wodurch diese Hyperpolarisation gesteuert wird ist nicht bekannt.

Durch die Auswertung der Adaptationsversuche zeigte sich, dass sofort nach dem Befüllen der Versuchskammern die Aktivität der Zellen in Pringsheim-Lösung gegenüber der Kontrolle deutlich erniedrigt ist. Dies ist auf eine veränderte ionale Zusammensetzung der Kulturlösung zurückzuführen. Die Zellen werden zwar in Pringsheim-Lösung kultiviert, es ist jedoch wahrscheinlich, dass sich durch die Fütterung oder durch anfallende Stoffwechselprodukte die Zusammensetzung der Lösung ändert. Die niedrigste Aktivität zeigen Zellen, die in 1-1-1-Lösung in die Kammern gefüllt wurden. Ein Vergleich des Ionengehaltes der Pringsheim-Lösung und der 1-1-1-Lösung (Anhang, Tab. A.1) zeigt, dass sowohl die extrazelluläre Kaliumionenkonzentration (um 0,75 mM) als auch die extrazelluläre Calciumionenkonzentration (um 0,15 mM) in der 1-1-1-Lösung höher sind. Beides führt dazu, dass Zellen, die aus der Pringsheim-Lösung (Kultur) in die 1-1-1-

Lösung überführt wurden, depolarisiert werden. Diese Depolarisation hebt die für eine Bewegung der Zelle zu Grunde liegende Hyperpolarisation auf und führt zu einer Inaktivität der Zelle. Innerhalb der ersten 10 Stunden nach dem Einfüllen in die Versuchskammer steigt die Aktivität der Zellen an, was auf eine Adaptation an die geänderten ionalen Verhältnisse schließen lässt. Ein derartiges Adaptationsverhalten ist auch von *Paramecium caudatum* bekannt und erst nach mehreren Stunden vollständig abgeschlossen (Oka et al., 1986; Machemer, 1989). Für die Tatsache, dass auch die Aktivität der Kontrollzellen steigt, gibt es zwei Möglichkeiten:

- Die Zellen werden durch das Einfüllen in die Versuchskammer stark mechanisch gereizt, was in der Summe zu einer Depolarisation führt. Gegen diese Möglichkeit spricht der lange Zeitraum der Reaktivierung von mehreren Stunden.
- Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen Zellen und Kammeroberfläche. Diese Möglichkeit wurde bereits bei anderen Ciliaten in Betracht gezogen (Machemer-Röhnisch et al., 1998a).

Die Vermutung einer Depolarisation der Zellen wird durch die Messung der Fortbewegungsgeschwindigkeiten horizontal ausgerichteter Zellen unterstützt. Dabei ist zu beachten, dass nur von den Zellen die Geschwindigkeit bestimmt werden kann, die aktiv sind. Der Effekt, dass die Geschwindigkeiten innerhalb der ersten zwei Stunden zunehmen, könnte sowohl auf eine Reaktivierung der Zellen als auch auf eine nachlassende Depolarisation zurückzuführen sein.

Als optimales Zeitfenster für verhaltensphysiologische Versuche kann ein Bereich zwischen vier und zehn Stunden nach dem Einfüllen der Zellen in die Versuchskammern angesehen werden. Innerhalb dieses Zeitraumes sind die meisten Zellen aktiv und die Geschwindigkeiten ändern sich nicht nennenswert. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu garantieren, ist es notwendig, die Versuche in standardisierten Versuchslösungen durchzuführen. Das Kulturmedium erfüllt die-

se Voraussetzungen nicht zuverlässig. Alle nachfolgenden Versuche wurden daher in Pringsheim-Lösung durchgeführt, da die Versuchszellen in den gewählten Beobachtungszeiträumen eine relativ gute Aktivität zeigten (Abb. 3.5). Bei den Versuchen im Fallturm waren die oben beschriebenen Befunde noch nicht bekannt. Die Versuche unter Schwerelosigkeit wurden, analog zu den elektrophysiologischen Experimenten, in 1-1-1-Lösung durchgeführt.

Bei der Analyse der langfristigen Adaptation (länger als 20 Stunden) ist zu beachten, dass sich die Zellen innerhalb dieses Zeitraumes geteilt haben können. Auf die Aktivität und die Geschwindigkeit der betrachteten Gesamtpopulation hat dieses jedoch anscheinend keinen Einfluss. Dies ist wohl auch darauf zurückzuführen, dass die Zellpopulation keiner synchronisierten Teilung unterliegt. Befunde früherer Verhaltensanalysen haben gezeigt, dass das Verhalten einer Zelle von ihrem Alter, bezogen auf die letzte Teilung, abhängt (Machemer, 1965a). Demnach ändern sich sowohl die Geschwindigkeit als auch die Frequenz spontaner Reversals mit dem Alter einer Zelle.

Die höchsten Geschwindigkeiten und die höchsten Reversalfrequenzen können in einem Zeitraum zwischen ein und vier Stunden nach der Teilung gemessen werden. Danach nimmt der Anteil bewegungsloser Zellen stetig zu. Um diese Befunde zu berücksichtigen und um den Effekt anderweitiger circadianer Rhythmen möglichst gering zu halten, wurden die Experimente einer Versuchsserie immer zur selben Tageszeit mit Zellen desselben Alters unter standardisierten Bedingungen (Temperatur, Licht) durchgeführt.

4.2. Sedimentation von *Stylonychia*

Die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit eines Einzellers ist für die Analyse seiner Schwerkraftwahrnehmung von zentraler Bedeutung. Einerseits wird die Orientierung einer Zellpopulation durch die Sedimentation beeinflusst, da eine im Vergleich zum Vortrieb hohe Sedimentationsgeschwindigkeit zu einer stärkeren Abweichung der Zellorientierung von der gemessenen Schwimmbahn führt

(2.6., Machemer et al., 1997), andererseits ist die Sedimentationsgeschwindigkeit notwendig für die Berechnung der Gravikinese (I.f).

Die Geschwindigkeit, mit der ein spheroider Körper in einem Medium zu Boden sinkt, wird durch das Zusammenwirken mehrerer Kräfte bestimmt. Zunächst durch die in Richtung der Erdbeschleunigung wirkende Gewichtskraft, die durch die Auftriebskraft vermindert wird. Der daraus resultierenden Kraft ist die Reibungskraft entgegengerichtet, die von der Viskosität des Mediums und vom Radius des Körpers abhängt. Sie lässt sich nach dem Stoke'schen Gesetz berechnen. Die Auftriebskraft hängt von der Dichtedifferenz zwischen Körper und Medium ab. Nach diesen Vorgaben lässt sich für eine Kugel mit einem Volumen von *Stylonychia* bei 1 g eine Sinkgeschwindigkeit von 170 $\mu\text{m/s}$ berechnen, was dem 1,5-fachen des aus den Zentrifugenexperimenten gewonnenen Wertes entspricht. Der Befund, dass die gemessene Sedimentationsgeschwindigkeit niedriger ist als die nach dem Stoke'schen Gesetz berechnete Sinkgeschwindigkeit, stimmt mit Daten aus früheren Messungen an anderen Ciliaten überein (Nagel et al., 1997). Die Sedimentationsgeschwindigkeit, die in Vorversuchen an *Stylonychia* erhoben wurde (180 $\mu\text{m/s}$), entspricht ungefähr dem oben berechneten Wert. Ein Grund für die Diskrepanz zwischen den Daten aus den Zentrifugenversuchen und den Vorversuchen könnte der begrenzte Sedimentationsraum sein. An den Wänden der Kammer treten auf Grund der Viskosität des Mediums Reibungskräfte auf, die einen hemmenden Effekt auf die Geschwindigkeit nah an der Wand sedimentierender Körper haben (Happel & Brenner, 1986). Bei anderen Ciliaten konnte gezeigt werden, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit nur dann unbeeinflusst bleibt, wenn die Zelle mindestens um den 100-fachen Zellradius von der Kammerwand entfernt sedimentiert (Winet, 1973). Bei den Vorversuchen wurden die Versuchskammern in der vertikalen Kammerposition belassen und zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten um 180° gedreht. Daher ist es wahrscheinlich, dass ein Großteil der Population in der Mitte des Flüssigkeitsraumes sedimentierte. Dadurch wäre jede Zelle etwa 2500 μm von jeder Kammerwand entfernt, was bei einer

vertikal sedimentierenden Zelle etwa dem 40-fachen des Zellradius entspräche. Bei den Zentrifugenversuchen musste die Kammer während der Phase ansteigender Beschleunigung in horizontaler Lage gehalten werden, um ein vorzeitiges Absedimentieren der Zellen zu verhindern. Dies führt jedoch dazu, dass die Zellen in zentrifugaler Richtung auf den distalen Kammerboden sedimentieren. Nach dem Drehen der Kammer in die vertikale Position (in Bezug auf den resultierenden Beschleunigungsvektor) sedimentieren die Zellen daher näher an der Kammerwand, so dass die Sedimentationsgeschwindigkeit erniedrigt sein könnte. Wie nah die Zellen an der Kammerwand sedimentieren, lässt sich schwer abschätzen und eine Messung ist aus technischen Gründen nicht realisierbar. Der beschriebene Effekt wird sich jedoch um so stärker auswirken, je höher die Beschleunigungsstufe ist. Der Wandeffekt trägt bei *Stylonychia* scheinbar wesentlich zu einer von der Stoke'schen Berechnung abweichenden Sedimentationsgeschwindigkeit bei. Nagel (1998) konnte jedoch für *Paramecium* zeigen, dass dieser Effekt allein nicht zur Erklärung der Differenz zwischen gemessener und berechneter Sedimentationsgeschwindigkeit ausreicht, denn durch die Viskositätseffekte wird S nur um etwa 4-10% reduziert. Neben dem Wandeffekt gibt es noch weitere Fakten, die einen Unterschied zwischen gemessenen und berechneten Sedimentationsgeschwindigkeiten erklären könnten.

- Das Stoke'sche Gesetz gilt für Kugeln, Ciliaten haben jedoch eher rotationsellipsoide oder, wie im Fall von *Stylonychia*, komplexere Zellformen.
- Die Oberfläche der Ciliaten ist nicht glatt sondern durch die Ciliatur strukturiert. So konnte gezeigt werden, dass die Cilien bei mit Nickelionen immobilisierten Zellen nicht am Zellkörper anliegen, sondern abstehen (Larsen & Satir., 1991).
- Körper mit der Größe eines Ciliaten besitzen eine kleine Reynolds-Zahl. Dadurch sind die Viskositätsverhältnisse verschoben, so dass es zu einer modifizierten Strömungsdynamik kommt.

- Ein durch eine ungleiche Dichteverteilung hervorgerufenen Drehmoment kann zur Rotation der Zelle führen und die Sinkgeschwindigkeit beeinflussen.
- Auch die bevorzugte Ausrichtung der Zellen während der Sedimentation kann zur beschriebenen Abweichung beitragen. Zellen, die mit ihrer Längsachse parallel zum Schwerkraftvektor sedimentieren, haben eine höhere Geschwindigkeit (Happel & Brenner, 1986). Dies konnte durch Messungen an *Paramecium caudatum* experimentell bestätigt werden (Watzke, 2000).

Aus den genannten Gründen ist es daher zwingend erforderlich, die Sedimentationsgeschwindigkeit einer Zelle zu messen und nicht zu berechnen. Bei einer ausreichend hohen Zellzahl werden individuelle Schwankungen in Zellgröße und Dichte durch die Medianbildung neutralisiert. Die Sedimentationsdaten werden unter den gleichen Bedingungen erhoben (Kammergröße, Temperatur) wie die Fortbewegungsgeschwindigkeiten. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit einmalig an einer Zellpopulation gemessen wurde. Die generelle Verwendung dieses Wertes für Gravikineseberechnungen hat den Nachteil, dass es keinen direkten Bezug zu den Geschwindigkeitsdaten der beobachteten Population gibt. Da aber eine Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit für jede einzelne Zellpopulation mit nicht vertretbarem Aufwand verbunden wäre, wird in dieser Arbeit, wie schon in früheren Veröffentlichungen, ein allgemeiner Sedimentationswert verwendet.

Die Genauigkeit der Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wird dadurch erhöht, dass Messungen bei verschiedenen Beschleunigungen vorliegen (Abb. 3.4). Dabei konnte bei *Stylonychia*, wie bei anderen Ciliaten auch (Nagel et al., 1997), ein linearer Zusammenhang zwischen Beschleunigung und Sedimentationsgeschwindigkeit nachgewiesen werden. Für die Zuverlässigkeit der Messung spricht der gute Regressionskoeffizient und die Tatsache, dass die Regressionsgerade die Ordinate nahe dem Koordinatenursprung schneidet. Beides sind Forderungen, die sich auch aus dem Stoke'schen Gesetz ergeben.

Die Schwerkraft wirkt über die Sedimentation gleichermaßen auf Zellen ein, die sich im freien Flüssigkeitsraum wie auf einer (senkrechten) Oberfläche befinden, ihre Wirkung muss durch die Zelle kompensiert werden. Für eine sitzende Zelle wäre dies durch die Anheftung der ventralen Cirren an die Oberfläche denkbar. Bei einer laufenden Zelle kann die Kompensation der Schwerkraft jedoch nur durch eine Orientierung und/oder die Modulation der Geschwindigkeit erfolgen.

4.3. Schwerkraftwahrnehmung von *Stylonychia*

Anhand der durchgeführten Experimente konnte festgestellt werden, dass *Stylonychia mytilus* in der Lage ist die Schwerkraft wahrzunehmen. Bei der Zelle konnte eine negative Gravitaxis nachgewiesen werden, die sowohl aus einer ausrichten- den Komponente (Gravorientierung) als auch aus einer geschwindigkeitsmodu- lierenden Komponente (Gravikinese) besteht. Dieser Befund wird durch Untersu- chungen bei unterschiedlichen Beschleunigungen (Zentrifuge, Fallturm) gestützt.

4.3.1. Gravorientierung bei Erdbeschleunigung

In vertikaler Versuchskammer orientiert sich ein überwiegender Teil der Ver- suchszellen mit dem anterioren Zellpol der Schwerkraft entgegen. Die gemesse- nen Orientierungskoeffizienten (0,06-0,16) sind zwar statistisch signifikant, im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Ciliaten jedoch gering. An *Paramecium caudatum* wurde bei 1 g ein Orientierungskoeffizient von 0,2 (Machemer et al., 1992), für *Didinium nasutum* und *Bursaria truncatella* Orientierungskoeffizienten von 0,5 (Machemer et al., 1993a; Krause, 1999) gemessen. Die bei *Stylonychia* gemessene Orientierung ist eindeutig auf die Schwerkraft zurückzuführen, denn in horizontal gestellter Versuchskammer konnte keine signifikante Orientierung nachgewiesen werden (alle anderen Versuchsbedingungen blieben konstant). Die Ausrichtung eines Ciliaten wird von einigen Autoren als rein physikalischer Pro- zess angesehen (1.2.4.). Zu der Annahme, dass dies auch für *Stylonychia* gilt, trägt der Befund bei, dass ein überwiegender Teil der Zellen mit der Längsachse paral-

lel zum Schwerkraftvektor sedimentiert (Tab. 3.5). Dabei konnte jedoch nicht gezeigt werden, in welche Richtung der anteriore Zellpol weist.

Für die Ausrichtung der Zelle durch physikalische Mechanismen gibt es zwei Hypothesen (1.2.4.). Sowohl eine unterschiedliche Verteilung der Dichte innerhalb der Zelle (statische Hypothese; Verworn, 1889) als auch die Zellform (hydrodynamische Hypothese; Roberts, 1970) können zu einer passiven Ausrichtung führen. Für *Stylonychia* können diese Verteilungen auf Grund von mikroskopischen Analysen der komplexen Zellgeometrie nur abgeschätzt werden. Die Zelle ist im anterioren Bereich durch das adorale Membranellenband flacher und breiter. Die für Abbildung 3.1 ausgemessenen Querachsen stellen die maximalen Zellbreiten dar und wurden bei einem Großteil der Messungen im anterioren Zellbereich gefunden. Die Zellhöhe ist im mittleren Zellbereich (zwischen anterior und posterior) maximal. Zum posterioren Zellpol hin wird die Zelle flacher und schmaler. Eine derartige Verteilung der Zellgröße sollte dazu führen, dass sich *Stylonychia* aus hydrodynamischen Gründen mit dem engeren posterioren Zellen-

Spekulation
Da *Stylonychia* dennoch eine, wenn auch schwache, negative Gravitaxis zeigt, kann von einer ausschließlichen Gültigkeit der hydrodynamischen Hypothese nicht ausgegangen werden. Diese Argumentation wird durch die Befunde von Winet & Jahn (1974) unterstützt, nach der auch Ciliaten eine Gravitaxis zeigen, deren Größenverhältnisse nicht der hydrodynamischen Hypothese entsprechen. Eine Abschätzung der Verteilung der Zelldichte bei *Stylonychia* spricht für die statische Hypothese. Das Cytoplasma erscheint im mikroskopischen Bild im posterioren Bereich dichter. Auch der größere der beiden Makronuklei sowie eventuell vorhandene restliche Nahrungsvakuolen befinden sich im hinteren Zellbereich. Diese ungleiche Verteilung der Zelldichte könnte ein Drehmoment induzieren, das dazu führt, dass die Zelle mit dem anterioren Zellpol entgegen der Schwerkraftrichtung ausgerichtet wird.

Eine rein physikalische Ausrichtung müsste nach einiger Zeit dazu führen, dass sich alle Zellen mit dem anterioren Zellpol der Schwerkraftrichtung entgegen fortbewegen und der Orientierungskoeffizient mit fortschreitender Zeit einen Wert nahe 1,0 erreicht. Dies konnte jedoch (selbst unter Hypergravitationsbedingungen) weder für *Stylonychia* noch für andere Ciliaten gefunden werden. Bei dem Ciliaten *Bursaria* führt nicht einmal ein Orientierungskoeffizient von 0,5 zu einer Graviakkumulation (Krause, 1999). Für *Paramecium* konnte sogar gezeigt werden, dass der Orientierungskoeffizient zehn Minuten nach dem Drehen einer Versuchskammer in die vertikale Lage von anfänglich 0,4 auf 0,2 absinkt (Bräucker et al., 1996). Diese Befunde weisen darauf hin, dass es neben den beschriebenen physikalischen Mechanismen noch weitere Einflüsse auf die Orientierung der Zellen gibt.

Bei *Stylonychia* trägt sehr wahrscheinlich die hohe Reversalrate zu einer Randomisierung der Orientierung einer Zellpopulation bei. Die Zelle bildet mit einer hohen Frequenz spontane Aktionspotentiale aus, die auf Grund der elektromotorischen Kopplung zu schnellen Rück-Vor-Bewegungen (Reversals) führen. Da sowohl Zellen in horizontaler Kammer als auch in vertikaler Kammer Reversals zeigen, ist eine gerichtete Fortbewegung über einen längeren Zeitraum, die letztlich zu einer Akkumulation führen würde, erschwert. Weiter kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle Zellen einer Population die gleiche Verteilung von Zelldichte und Zellgröße ausweisen, so dass die oben für die physikalische Ausrichtung gemachten Prämissen nicht für alle Zellen einer Population gelten. Taneda et al. (1987) zeigten bei *Paramecium*, dass die Breite des posterioren Zellpols positiv mit dem Zellalter korreliert.

Bei dem Ciliaten *Loxodes striatus* wurde in einer senkrecht stehenden Versuchskammer eine Bevorzugung der vertikalen Orientierung gegenüber der horizontalen Orientierung beobachtet. Dieses Phänomen wurde als „neutrale“ oder „bimodale“ Gravitaxis bezeichnet (Machemer-Röhnisch et al., 1993; Hemmersbach-Krause & Briegleb, 1992). Da sich für ein derartiges Verhalten kaum ein physika-

lischer Mechanismus zu Grunde legen lässt, wird die Orientierung hier offenbar physiologisch vermittelt. Als Rezeptionsort wird das Müller'sche Organell vermutet (1.2.4.). Bei *Stylonychia* konnte bisher kein vergleichbares Zellorganell entdeckt werden. Für den Flagellaten *Euglena gracilis* wird ebenfalls ein physiologischer Mechanismus der Graviorientierung gefordert (Häder et al., 1995). Befunde, nach denen eine UV-Behandlung (Häder & Liu, 1990) oder die Applikation verschiedener Schwermetalle (Stallwitz & Häder, 1994) zu einer Aufhebung der negativen Gravitaxis führen, sollen dies bestätigen. Eine Beeinflussung des Membranpotentials durch die Anwendung verschiedener in die Membran inkorporierter Agenzien (Häder & Hemmersbach, 1997) und eine daraus folgende Modifikation der Gravitaxis soll auf einen aktiven Mechanismus der Graviperzeption hindeuten. Derartige Untersuchungen beweisen jedoch lediglich die Möglichkeit der physiologischen Beeinflussung der Graviorientierung und schließen einen physikalischen Mechanismus nicht aus.

Bei einer schwimmenden *Stylonychia* kann eine erhöhte Aktivität der ventralen Cirrenguppen beobachtet werden (Machemer, 1965b). Zellen, die chemisch gereizt werden, lösen sich von der Oberfläche und fangen an zu schwimmen (Machemer, 1965a). Offensichtlich führt also eine relativ starke Hyperpolarisation dazu, dass aus der Laufbewegung eine Schwimmbewegung wird. Durch die hyperpolarisationsabhängig erhöhte Cirrenaktivierung löst sich die Zelle von der Oberfläche ab. Die Geschwindigkeit schwimmender Zellen ist höher als die von laufenden Zellen (Abb. 3.27). Interessanterweise ist auch der Orientierungskoeffizient schwimmender Zellen höher, die Orientierung der Zellen damit präziser. Der Rückschluss, die Orientierung der Zelle würde alleine durch das Membranpotential bestimmt werden, ist jedoch hieraus nicht zulässig. Vielmehr konnte beobachtet werden, dass die Frequenz schneller Rück-Vor-Bewegungen bei schwimmenden Zellen seltener auftritt (Machemer & Deitmer, 1987). Es ist anzunehmen, dass eine physikalische Orientierung durch einen veränderten physiologischen Zustand modifiziert wird.

Ein weiterer Grund dafür, warum die Orientierung laufender Zellen weniger ausgeprägt ist als die von schwimmenden Zellen könnte darin liegen, dass eine laufende Zelle für eine Ausrichtung weniger Freiheitsgerade hat als eine schwimmende Zelle. Aus dieser Vermutung müsste jedoch gefordert werden, dass die Zelle bei einer aktiven Orientierungsreaktion ihre Bewegung beliebig steuern kann. Bei einer physikalischen Ausrichtung der Zelle würde ein Freiheitsgrad ausreichen und zu einer signifikanten Ausrichtung der Zelle führen.

4.3.2. Gravikinese bei Erdbeschleunigung

Im Gegensatz zur Graviorientierung ist die schwerkraftabhängige Modulation der Vortriebsgeschwindigkeit (Gravikinese) in jedem Falle eine physiologische Leistung der Zelle. Die Geschwindigkeit auf- und abwärtslaufender Zellen unterscheidet sich bei *Stylonychia* nicht (Abb. 3.10, Tab. 3.6). Ein ähnlicher Befund wurde auch bei *Loxodes* gefunden (Bräucker et al., 1992). Die Gravikinese hängt damit bei diesen Ciliaten alleine von der Sedimentationsgeschwindigkeit ab. Dies bedeutet auch, dass bei 1 g die Sedimentationsgeschwindigkeit vollständig durch die Gravikinese kompensiert wird. Mit den erhobenen Sedimentationsdaten ist die Gravikinese zwar signifikant (3.2.4.), ihr numerischer Wert wird jedoch auf Grund der obigen Annahmen zur Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit möglicherweise überschätzt. Durch eine statistische Berechnung kann gezeigt werden, bis zu welcher Sedimentationsgeschwindigkeit die Gravikinese noch signifikant ist. Dazu werden verschiedene S-Werte, kleiner als 111 $\mu\text{m/s}$ mit den richtungsabhängigen Geschwindigkeiten verrechnet und die modifizierten Datensätze mit dem U-Test auf Signifikanz untersucht. Dabei ergab sich, dass erst ab einer Sedimentationsgeschwindigkeit kleiner als 8 $\mu\text{m/s}$ die Gravikinese nicht mehr signifikant nachweisbar ist. Eine derart starke Beeinflussung der Sedimentationsgeschwindigkeit durch Wandeffekte ist unwahrscheinlich, so dass die bei *Stylonychia* berechneten Werte der Gravikinese, auch bei verminderter Sedimentationsgeschwindigkeit, als signifikant angesehen werden können.

Die Kompensation der Sedimentationsgeschwindigkeit durch die Gravikinese ist nicht für alle Species einheitlich. Bei den kleinsten bisher untersuchten Ciliaten, *Tetrahymena pyriformis*, konnte eine überkompensierende Gravikinese (130% von S) nachgewiesen werden (Kowalewski et al., 1998). Bei dem riesigen Ciliaten *Bursaria truncatella* wird die Sedimentationsgeschwindigkeit von 923 $\mu\text{m/s}$ um etwa 70% durch die Gravikinese (665 $\mu\text{m/s}$) kompensiert (Krause, 1999). Ein ähnliches Verhältnis konnte bei *Didinium nasutum* gemessen werden (Machemer et al., 1993a). Eine geringere Kompensation konnte für *Paramecium tetraurelia* (28%; Hemmersbach-Krause et al., 1993a; 65%; Nagel, 1998) und *Paramecium caudatum* (45%; Machemer et al., 1991) nachgewiesen werden.

Allgemein lässt sich festhalten, dass bei Zellen mit einem höheren Zellvolumen auch ein höherer Gravikinesewert gemessen werden kann. Dies ist verständlich, da mit dem Zellvolumen nach Stokes auch die Sedimentationsgeschwindigkeit steigt. Die Kompensationsfähigkeit dagegen korreliert nicht mit der Zellgröße (Bräucker & Hemmersbach, 2002).

Gemäß der spezialisierten Statocystenhypothese wird die Gravikinese durch die Kraft, die das Cytoplasma auf die jeweils unten liegende Membran ausübt, induziert. Durch diese Kraft werden Ionenkanäle geöffnet, die über die Modulation des Membranpotentials zu einer Geschwindigkeitsänderung führen (Machemer et al., 1991). Die für eine Gravitransduktion zur Verfügung stehende Energie hängt in erster Linie von der Zelldichte und der Zellgröße ab. Die in dieser Arbeit an *Stylonychia* erhobenen Daten zur Zellgröße entsprechen in etwa denen früherer Messungen (Machemer & Deitmer, 1987). Für die Zelldichte wurden Werte anderer Ciliaten zu Grunde gelegt. Dies scheint zulässig, da sich die bisher für verschiedene Species veröffentlichten Daten unwesentlich voneinander unterscheiden (z.B. *Loxodes*: 1,036 g/cm^3 , Neugebauer et al., 1998; *Paramecium*: 1,048 g/cm^3 , Watzke, 2000). Die Dichte geht in die Berechnung der Energie, die auf Grund der Masse der Zelle mindestens für die Gravitransduktion zur Verfügung steht, mit ein. Der Fehler, der daraus resultiert, dass in die gemessene Gesamtdichte immer

auch die Dichte der Zellmembran eingeht, ist gering, da der Anteil der Zellmembran am Gesamtvolumen der Zelle niedrig ist. Bei *Stylonychia* konnte auf Grund der Zellabmessungen und der durchschnittlichen Dicke der Membran von 5 nm (Eckert & Randall, 1986) ein Anteil von 5% berechnet werden. Die für *Stylonychia* ermittelte Mindestenergie von $4,9 \cdot 10^{-19}$ Nm ist um etwa zwei Größenordnungen vom thermischen Rauschen entfernt, so dass eine Gravitransduktion gemäß der spezialisierten Statocystenhypothese theoretisch möglich ist.

Für die Bestimmung der richtungsabhängigen Gravikinesen ist es notwendig, den schwerkraftunabhängigen Vortrieb der Zelle zu kennen. Als erste Abschätzung wurde die Geschwindigkeit horizontal laufender Zellen zu Grunde gelegt. Bei *Paramecium caudatum*, das wie *Stylonychia* über eine bipolare Rezeptorverteilung verfügt, hebt sich in dieser Lage die durch die Schwerkraft induzierte De- und Hyperpolarisation auf (Machemer et al., 1991). Die horizontal laufenden Zellen in der vertikalen Kammer zeigen eine etwas höhere Laufgeschwindigkeit, als die Zellen aus der horizontalen Versuchskammer. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen in vertikaler Kammer leicht hyperpolarisiert sind. Ein Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Ausrichtung der Zellen in Bezug auf den Schwerkraftvektor liegen. Während sich die Zellen in vertikaler Versuchskammer mit der Ventralseite parallel zum Schwerkraftvektor fortbewegen, ist bei den Zellen in der horizontalen Kammer die Ventralseite parallel zum Schwerkraftvektor ausgerichtet. Scheinbar wird die Zelle auf Grund einer unterschiedlichen Rezeptorverteilung durch eine gleichzeitige Reizung der anterioren und posterioren Lateralseite hyperpolarisiert. Hier besteht ein grundlegender Unterschied zu einer schwimmenden Zelle. Bei *Paramecium*, das sich auf einer helikalen Schwimmbahn fortbewegt, drückt das Cytoplasma auf einen ständig wechselnden Membranbereich. Dadurch wird die Potentialänderung über einen längeren Zeitraum integriert. Die Geschwindigkeit horizontal laufender Zellen in der vertikalen Kammer (993 $\mu\text{m/s}$) entspricht besser dem schwerkraftunabhängigen Vortrieb, der aus den Hypergravitationsexperimenten (1012 $\mu\text{m/s}$) gewonnen werden konnte. Werden

die richtungsabhängigen Gravikinesen anhand dieses Vortriebswertes berechnet, so ergibt sich, dass die Gravikinese aufwärtslaufender Zellen die Sedimentationsgeschwindigkeit teilweise kompensiert, die Sedimentationsgeschwindigkeit abwärtslaufender Zellen dagegen überkompensiert wird (Tab. 3.7).

Sowohl Graviorientierung als auch Gravikinese führen bei *Stylonychia* zu einer negativen Gravitaxis. Beide Komponenten können durch äußere Faktoren beeinflusst werden. Für den Flagellaten *Euglena* wird postuliert, dass der Aufenthaltsort einer Zelle in der Wassersäule aus dem Zusammenwirken einer Gravitaxis und einer Phototaxis resultiert (Häder, 1987). Durch Adaptationsversuche konnte bei *Stylonychia* gezeigt werden, dass die Zellen bereits kurz nach dem Einfüllen in die Versuchskammer eine Graviorientierung zeigen. Die nicht signifikanten Orientierungen zum Zeitpunkt „0 Stunden“ sind auf die erhöhte Inaktivität und damit eine niedrige Datenzahl zurückzuführen. Bei der schwerkraftabhängigen Geschwindigkeitsmodulation ist ein Trend, von einer bei Versuchsbeginn niedrigen zu einer erst nach mehreren Stunden maximal werdenden Gravikinese, zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass der Ausrichtung der Zelle und der Gravikinese unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen. Diese Vermutung wird durch experimentelle Befunde bei *Paramecium* unterstützt, nach denen Zellen, die einer erniedrigten Temperatur ausgesetzt waren, zwar eine Gravikinese, aber keine Graviorientierung ausbildeten (Freiberger, 1997). Machemer et al. (1993b) konnten zeigen, dass bei *Paramecium caudatum* das Verhältnis aus Gravikinese und Vortrieb (Gravikinesekoeffizient) nicht mit dem Orientierungskoeffizienten korreliert. Sollte es also eine physiologische Modulation der (ursprünglich physikalisch herbeigeführten) Graviorientierung geben, so beruht diese wahrscheinlich auf einem anderen Mechanismus als die Gravikinese.

4.3.3. Verhalten bei erhöhter Beschleunigung

Die Orientierung von *Stylonychia* korreliert in einem Bereich von 1 g bis 4 g positiv mit der resultierenden Beschleunigung (Abb. 3.17). Damit konnte nachgewie-

sen werden, dass die Ausrichtung der Zelle durch die Schwerkraft induziert wird. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden in Abbildung 3.17 liegt etwa im Ursprung des Koordinatensystems: Bei einer Beschleunigung von 0 g ist keine Orientierung mehr zu erwarten. Eine Beschleunigung von 4 g ist dagegen noch nicht ausreichend, um eine Sättigung in der Präzision der Graviorientierung zu erreichen. Dies wäre, bei einem rein physikalischen Mechanismus auch bei höheren Beschleunigungen, nicht zu erwarten. Ein mit steigender Beschleunigung vermehrt auftretender, entgegengewirkender physiologischer Prozess, könnte jedoch die Orientierung beeinflussen (s.o.). Bei anderen Ciliaten konnten ebenfalls lineare Zusammenhänge zwischen Orientierung und Beschleunigung gezeigt werden. Bei logarithmischer Auftragung kann an diese Beziehung eine sigmoidale Funktion angepasst werden (Nagel & Machemer, 2000a). Machemer & Bräucker (1996) beurteilen aus der Abweichung der Daten von dieser sigmoidalen Funktion, die Beteiligung physikalischer oder physiologischer Mechanismen an der Gravitaxis. Die an *Stylonychia* erhobenen Daten zeigen nur geringe Abweichungen von der sigmoidalen Funktion (keine Abbildung), was die Vermutung unterstützt, dass die Zelle physikalisch ausgerichtet wird.

Die Auftragung der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Beschleunigung ergibt bei *Stylonychia* nicht, wie bei anderen Ciliaten, eine stetige Beziehung (Abb. 3.11). Bei einer Beschleunigung von 1,3 g und 2,5 g sind die Geschwindigkeiten der Zellen unabhängig von der Fortbewegungsrichtung erniedrigt, was nur durch eine Depolarisation der Zellen erklärt werden kann. Die Datenzahlen sind in allen Fällen ausreichend groß und die Konfidenzbereiche sind klein, so dass dieses Phänomen kein zufälliges Messartefakt sein kann. Für die Berechnung der Gravikinese sind diese erniedrigten Geschwindigkeiten jedoch anscheinend unerheblich (3.2.5.). Betrachtet man die um die Sedimentationsgeschwindigkeit korrigierten, richtungsabhängigen Geschwindigkeiten der Zellen (Abb. 3.12), so fällt auf, dass diese in einem Bereich von 1,3 g bis 4 g quasi linear verlaufen. Die Differenzen zwischen den um S korrigierten Auf- und Abwärts-

laufgeschwindigkeiten stellen die Gravikinesewerte für die betreffenden Beschleunigungsstufen dar. *Stylonychia* ist demnach in der Lage, unabhängig von den Absolutwerten der Fortbewegungsgeschwindigkeiten eine Gravikinese aufrechtzuerhalten. Ein derartiges Verhalten ist dann sinnvoll, wenn die Geschwindigkeit ständigen Schwankungen unterliegt, eine erfolgreiche schwerkraftabhängige Geschwindigkeitsmodulation jedoch aufrechterhalten bleiben soll. Dies ist bei *Stylonychia* zu vermuten. Die Zelle zeigt in Abhängigkeit vom Zellzyklus verschiedenartige Bewegungsmuster mit unterschiedlichen Fortbewegungsgeschwindigkeiten (vgl. Machemer, 1965a).

In einem niedrigen Beschleunigungsbereich (1,0 g-1,2 g) nimmt die Differenz zwischen auf- und abwärtslaufenden Zellen schneller zu als bei höheren Beschleunigungen (Abb. 3.13). Die gemessenen Differenzen können nicht allein auf die Sedimentationsgeschwindigkeit zurückgeführt werden, wie durch den Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden mit der Steigung der Sedimentations-Beschleunigungsfunktion zu erkennen ist. Zudem zeigen die unterschiedlichen Steigungen für die Korrelationen der Aufwärts- und Abwärtsgeschwindigkeiten die Beteiligung einer aktiven Regulation durch die Zelle.

Werden die richtungsabhängigen Geschwindigkeiten um die Sedimentationsgeschwindigkeit korrigiert (Abb. 3.12), so kann durch Extrapolation der Messdaten auf 0 g der schwerkraftunabhängige Vortrieb der Zelle ($P=1012 \mu\text{m/s}$) abgeschätzt werden. Das Zusammentreffen der Regressionsgeraden auf der Ordinate kann nicht als Indiz dafür gewertet werden, dass für die schwerkraftabhängige Geschwindigkeitsmodulation keine Schwelle nachzuweisen ist, da der Verlauf der Regressionsgeraden zwischen 0 g und 1 g nicht gesichert ist.

Die um die Sedimentationsgeschwindigkeit korrigierten Geschwindigkeiten stellen die aktiven schwerkraftabhängigen Geschwindigkeiten der Zellen dar. Diese setzen sich aus den Gravikinesen und dem schwerkraftunabhängigen Vortriebswerten zusammen. Anhand der Differenzen zwischen den korrigierten Geschwindigkeiten und P kann auf die richtungsabhängigen Gravikinesen zurückgeschlos-

sen werden (vgl. Abb. 3.14). In einem Bereich größer als 1,3 g nehmen die Gravikinesen auf- und abwärtslaufender Zellen mit der Beschleunigung zu. Dabei trägt Δ_D weniger zur Kompensation der Sedimentationsgeschwindigkeit bei als Δ_U . Im Beschleunigungsbereich kleiner als 1,3 g stellt sich das schwerkraftabhängige Verhalten der Zelle jedoch anders dar. Während die Gravikinese aufwärtslaufender Zellen zunimmt, wird die der abwärtslaufenden Zellen vom Betrag her kleiner (Tab. 3.8). Abwärtslaufende Zellen sind in diesem Beschleunigungsbereich offenbar nur sehr wenig in der Lage, die Auswirkungen der Sedimentation zu kompensieren. Da Δ_U in gleichem Maße zunimmt, wie Δ_D abnimmt, bleibt die Gravikinese der Gesamtpopulation im Bereich von 1,0 g bis 1,3 g nahezu konstant.

Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens kann auf der Ebene des Membranpotentials gefunden werden. Durch die Kraft, die das Cytoplasma auf die jeweils unten liegende Membran ausübt, wird, durch die Öffnung mechanosensitiver Kanäle, ein Rezeptorpotential generiert. Die Amplitude dieses Rezeptorpotentials steigt mit zunehmender Beschleunigung, also zunehmender Kraft, linear an (Abb. 4.1). Das entstandene Rezeptorpotential addiert sich zum bestehenden Membranpotential der Zelle. Bei einer abwärtsschwimmenden Zelle führt dies zu einer Depolarisation. Erreicht diese Depolarisation den Schwellenwert der spannungsabhängig aktivierbaren Calciumkanäle (niederschwelliger Typ I) wird ein regenerativer Prozess in Gang gesetzt.

Das daraus resultierende Aktionspotential hat einen Einfluss auf das Bewegungsverhalten abwärtslaufender Zellen. Dass die Fähigkeit der Zellen, die Sedimentationsgeschwindigkeit zu kompensieren abnimmt, könnte mit einer durch die an das Aktionspotential anschließende Phase der Hyperpolarisation und der damit verbundenen Erhöhung der Cirrenaktivität abwärtslaufender Zellen erklärt werden. Das Aktionspotential hat eine konstante Amplitude. Bei höheren Beschleunigungen überwiegt der Effekt des gradierten Aktionspotentials (durch Aktivierung der Calciumkanäle vom Typ-II), der eine reizabhängige Steuerung des Cirrenschlages bewirkt.

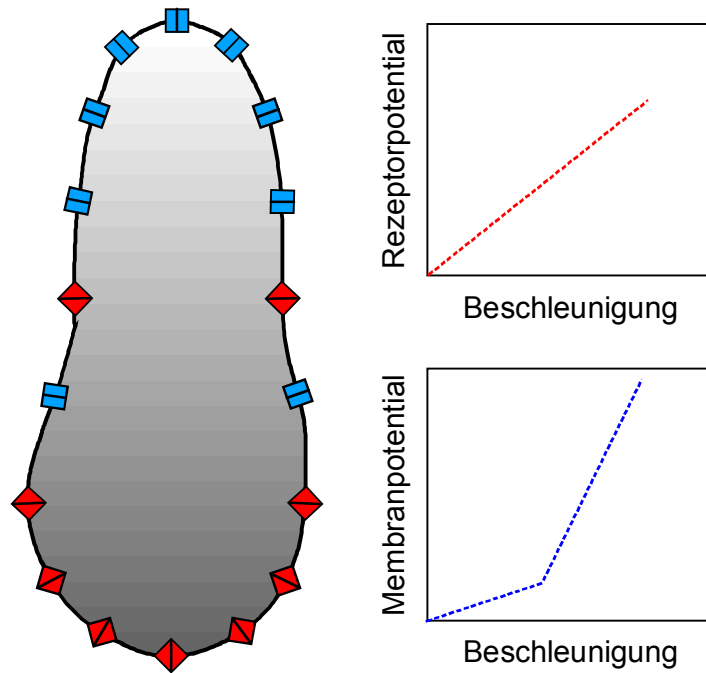


Abb. 4.1: Erklärungsmöglichkeit für die verminderte Kompensationsfähigkeit abwärtslaufender Zellen bei Beschleunigungen kleiner als 1,3 g. Es wird vorausgesetzt, dass das Rezeptorpotential linear von der Beschleunigung abhängt und sich auf das Ruhepotential der Zelle addiert. Bei geringen Depolarisationen öffnen bereits einige spannungsabhängige Calciumkanäle und setzen einen regenerativen Prozess in Gang. Ab einer bestimmten Beschleunigung werden Aktionspotentiale ausgelöst, die zu dem dargestellten steileren Anstieg des Membranpotentials führen.

Als andere Erklärungsmöglichkeit kann angenommen werden, dass in die Zellmembran von *Stylonychia* zwei unterschiedliche Typen von Mechano(=Gravi)-Rezeptoren inkorporiert sind: Der eine Typ arbeitet schon im niedrigen Beschleunigungsbereich (bei geringeren mechanischen Reizen), der andere Typ besitzt eine höhere Aktivierungsschwelle und öffnet erst bei größeren Beschleunigungen. (Abb. 4.2). Das quantitative Verhältnis dieser beiden Kanaltypen ist dabei zunächst unwesentlich, wichtig ist, dass die bipolare Verteilung aufrechterhalten bleibt. Die nachlassende Kompensationsfähigkeit für die wachsende Sedimentationsgeschwindigkeit zwischen 1,0 g und 1,3 g ließe sich dann dadurch erklären, dass die Kanäle des ersten Typs bereits geöffnet sind, während die Öffnungswahr-

scheinlichkeit der Kanäle des zweiten Typs erst mit steigender Beschleunigung zunimmt. Beschleunigungen deutlich oberhalb 1 g stellen für die Zelle einen „unnatürlichen“ Reiz dar. Es stellt sich daher die Frage, warum bei *Stylonychia* zwei unterschiedliche Typen von Rezeptorkanälen existieren sollten, denn hieraus kann zunächst kein Selektionsvorteil abgeleitet werden. Diese Frage soll in 4.3.4. erörtert werden.

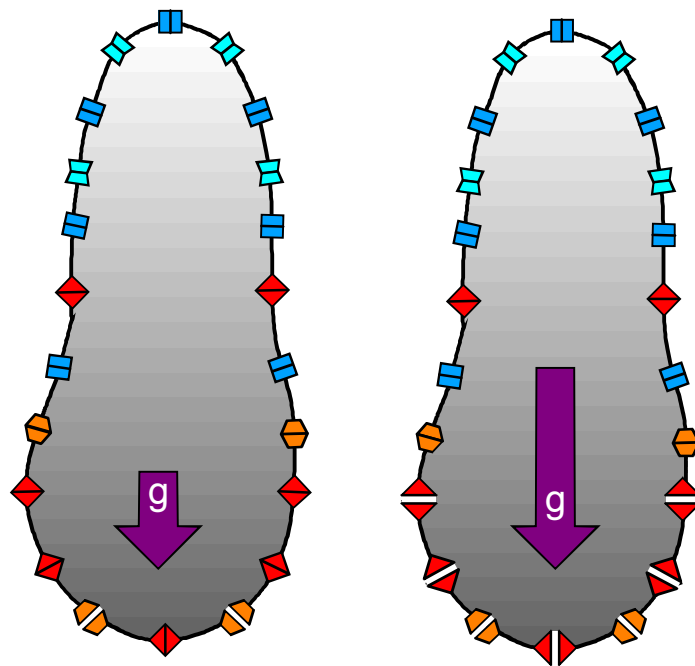


Abb. 4.2: Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die nachlassende Kompensationsfähigkeit abwärtslaufender Zellen durch die Annahme zweier Typen von mechano(=gravi)sensitiven Kanälen mit unterschiedlichen Aktivierungsschwellen. Der erste Kanaltyp wird schon bei Beschleunigungen um 1g aktiviert. Mit zunehmendem Druck des Cytoplasmas wird eine zweite Klasse von Kanälen aktiviert (orange: Ca^{2+} -Mechano(=Gravi)rezeptorkanäle mit niedriger Aktivierungsschwelle, rot: Ca^{2+} -Mechano(=Gravi)rezeptorkanäle mit hoher Aktivierungsschwelle, blau: K^{+} -Mechano(=Gravi)rezeptorkanäle).

Mit dem gezeigten „zweigeteilten“ Beschleunigungsverhalten unterscheidet sich *Stylonychia* von anderen bisher untersuchten Ciliaten. Bei *Loxodes* und *Paramecium* konnte ein kontinuierlicher, linearer Zusammenhang zwischen richtungsabhängiger Gravikinese und der Beschleunigung nachgewiesen werden (Machemer-

Röhnisch et al., 1993; Nagel 1998). Die Kompensation der Sedimentationsgeschwindigkeit nimmt bei *Paramecium* mit steigender Beschleunigung linear ab (Abb. 3.15). Einen Sonderfall stellt *Didinium nasutum* dar. Dieses Ciliat besitzt nur depolarisierende Mechanorezeptorkanäle. Eine Gravikinese aufwärtsschwimmender Zellen konnte, wie auf Grund der Statocystenhypothese vorhergesagt, in diesem Fall nicht nachgewiesen werden (Machemer-Röhnisch et al, 1998; Bräucker et al., 1994).

4.3.4. Evolutive Aspekte der Schwerkraftwahrnehmung

Für einen Einzeller kann die Wahrnehmung der Schwerkraft wichtig sein, um Lebensräume mit günstigen Umweltbedingungen aufzusuchen und solche mit ungünstigen zu meiden. Eine Möglichkeit dafür besteht darin, die Fortbewegungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Fortbewegungsrichtung zu verändern. Bei *Stylonychia* wurde bis zum Ende des Messbereiches (4 g) ein Anstieg der Gravikinese etwa um den Faktor 3,5 gemessen. Bei *Paramecium* konnte auch noch bei 7 g keine Sättigung der Gravikinese nachgewiesen werden (Machemer et al. 1998), diese Zelle ist in der Lage auch bei einer Beschleunigung von 9 g noch gegen die Schwerkraft anzuschwimmen. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass solch starke Beschleunigungen in der natürlichen Umgebung dieser Ciliaten nicht vorkommen. Eine Erklärung könnte in einer geringen Spezialisierung der an der Reiztransduktion beteiligten Mechanorezeptorkanäle liegen (Machemer, 1998b). Die Kanäle in der Zellmembran würden sowohl bei Mechanotransduktion als auch bei der Schwerkraftwahrnehmung aktiviert werden.

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen konnten Parallelen in der Verteilung und der Ionenabhängigkeit zwischen Thermorezeptorkanälen und mechanosensitiven Kanälen bei *Paramecium* gefunden werden (Tominaga & Naitoh, 1994). Eventuell handelt es sich hier um dieselbe Gruppe von Kanälen, damit wären die in der genannten Arbeit untersuchten Rezeptoren für mehr als eine Reizqualität sensibel. Zur Klärung dieser Fragestellung müssten Untersuchungen der Gravi-

perzeption bei gleichzeitiger Variation der Umgebungstemperatur durchgeführt werden.

Eine Betrachtung des evolutiven Hintergrundes der Mechano- und Gravitransduktion eröffnet die Frage, welche Reizwahrnehmung die ursprünglichere gewesen ist. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass im Laufe der Evolution ein Selektionsdruck für Organismen zur Reaktion auf hohe Beschleunigungen bestanden hat, ist zu vermuten, dass es sich bei den Gravirezeptorkanälen um abgeleitete Strukturen handelt. Für einen Organismus ist es möglicherweise wichtiger mechanische Reize aus der Umwelt wahrzunehmen, wie z.B. Berührungen mit Hindernissen, durch Räuberorganismen verursachte Berührungen oder Strömungen des umgebenden Mediums. Es ist gut vorstellbar, dass aus einer ursprünglichen Gruppe von mechanosensitiven Kanälen, mit einem relativ großen Arbeitsbereich und einer geringen Reizschwelle, spezialisierte Kanäle für die Schwerkraftwahrnehmung entstanden sind. Für diese Vermutung sprechen erste Untersuchungen zur Elektrophysiologie von gravisensitiven Kanälen bei *Paramecium*, nach denen diese, im Gegensatz zu den mechanosensitiven Kanälen, in geringer Anzahl vorhanden sind (Gebauer et al., 1999). Die Untersuchungen von Gravirezeptorpotentialen bei *Stylonychia* bestätigen diesen Befund (4.6.1.). Die bei anderen Ciliaten geforderte Beteiligung des Cytoskeletes (Machemer, 1998a) ist auch für *Stylonychia* wahrscheinlich. Demnach ist es vorstellbar, dass während der Evolution Filamentverbindungen (viskoelastische Elemente) zu einer Gruppe von Mechanorezeptorkanälen gebildet wurden, um eine Erhöhung der Empfindlichkeit für die, im Vergleich zu mechanischen Reizen, niedrigen Reizenergien bei der Schwerkraftwahrnehmung zu erreichen (Machemer-Röhnisch et al., 1998b).

4.3.5. Verhalten bei erniedrigter Beschleunigung

Die Untersuchung des Verhaltens von *Stylonychia* unter Schwerelosigkeitsbedingungen ist aus mehreren Gründen notwendig. In erster Linie kann durch einen Stufenübergang nach μg geprüft werden, ob das zuvor bei 1 g beobachtete Verhal-

ten wirklich auf die Schwerkraft zurückzuführen ist. Für *Stylonychia* wurde dies durch die Beobachtung nachgewiesen, dass die Präzision der Orientierung nach dem Übergang in die Schwerelosigkeit abnimmt (Abb. 3.26). Eine zeitgenaue Auftragung der Veränderung des Orientierungskoeffizienten war auf Grund einer niedrigen Datenzahl nicht möglich.

Eine Abnahme des Orientierungskoeffizienten während der μ g-Phase konnte auch bei *Paramecium* beobachtet werden (Bräucker et al., 1998). Dabei nahmen bei Eintritt der Schwerelosigkeit die Orientierungskoeffizienten nicht sofort, sondern mit einer Zeitkonstante zwischen 4 s und 21 s ab. Dieser Befund ist dadurch erklärbar, dass die Zellen, auch ohne ausrichtenden Reiz, ihre Schwimmbahn beibehalten haben. Die Randomisierung der Population erfolgt nach einiger Zeit durch die Begrenzung des Schwimmraumes (Kammerwandungen) und durch spontane Reversals.

Gemäß der spezialisierten Statocystenhypothese wird unter Schwerelosigkeitsbedingungen kein Druck mehr auf die unten liegende Membran ausgeübt, damit kann auch keine Gravikinese mehr ausgebildet werden. Die vormals richtungsabhängigen Geschwindigkeiten sollten in der Geschwindigkeit des schwerkraftunabhängigen Vortriebs (P) zusammenfallen. Dies war bei *Stylonychia* innerhalb der 4,75 s Schwerelosigkeit der Fall. Der schwerkraftunabhängige Vortrieb der Zelle konnte so mit 572 μ m/s bestimmt werden und ist damit deutlich niedriger als der Wert, der anhand der Zentrifugenexperimenten erhoben wurde. Auch ein Vergleich der Fortbewegungsgeschwindigkeiten ergibt bei den ZARM-Versuchen ebenfalls deutlich niedrigere Werte. Die für 1 g berechnete Gravikinese (etwa – 150 μ m/s) ist aber, im Vergleich zu den 1 g-Daten aus den Zentrifugenexperimenten, nur leicht erhöht. Dies bestätigt den Befund, dass *Stylonychia*, unabhängig vom Betrag der Absolutgeschwindigkeiten, in der Lage ist, konstante Gravikinesen auszubilden. Die in den Fallturmexperimenten bei 1 g ermittelten Gravikinesewerte bewirken eine Überkompensation der Sedimentationsgeschwindigkeit. Da die Beträge der Absolutgeschwindigkeiten für die Gravikinese scheinbar unerheb-

lich sind, scheint es zulässig, den P-Wert proportional auf die Geschwindigkeiten des Zentrifugenexperimentes zu extrapolieren. Durch dieses Verfahren ergäbe sich ein P-Wert von 931 $\mu\text{m/s}$. Auf die Betrachtung des schwerkraftunabhängigen Vortriebs wird zu einem späteren Zeitpunkt näher eingegangen werden.

Ein Grund für die vergleichsweise niedrigen Geschwindigkeiten bei den Fallturmexperimenten könnten unterschiedliche Versuchsbedingungen sein. Bei den Fallturmversuchen wurde, analog zu den elektrophysiologischen Versuchen, eine andere Experimentierlösung (1-1-1) verwendet. Aus den später durchgeführten Adaptationsversuchen ist zu erkennen, dass Zellen in dieser Lösung bis zu einem Zeitpunkt von acht Stunden niedrigere Geschwindigkeiten aufweisen. Die Adaptationszeit bei den Fallturmversuchen betrug vier Stunden. Die Kulturbedingungen im Fallturm entsprachen nicht denen im Kölner Labor. Unter den Experimentierbedingungen war keine optimale Kultivierung (sterile Kultur der Futterorganismen) möglich.

Die beobachtete erniedrigte Fortbewegungsgeschwindigkeit wirkt sich jedoch, wie beschrieben, nicht negativ auf die Schwerkraftwahrnehmung von *Stylonychia* aus.

Bei der Betrachtung der Aufwärtslaufgeschwindigkeiten bei 1 g ist etwa 3 Sekunden vor dem Abwurf der Versuchskapsel eine nachhaltige Erhöhung der Geschwindigkeit zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Signal-Diode angeschaltet, die den bevorstehenden Beginn der μg -Phase signalisieren sollte. Ob dieser Lichtreiz die Ursache der Geschwindigkeitsänderung ist, muss in Frage gestellt werden, da die Geschwindigkeiten der horizontal und abwärtslaufenden Zellen unverändert bleibt. Lichtabhängige Verhaltensänderungen sind bei *Stylonychia* bisher nicht systematisch untersucht worden. Aus eigenen Beobachtung ist jedoch bekannt, dass es erst bei relativ hohen Bestrahlungsstärken ($> 100 \text{ W/m}^2$), zu einer Erhöhung der Reversalfrequenz und daher vermutlich zu einer Depolarisation der Zelle kommt.

Durch den Wegfall der Sedimentationsgeschwindigkeit in der μ g-Phase kann die relaxierende Gravikinese aus dem Mittelwert der Geschwindigkeiten vormals auf- und abwärtslaufender Zellen berechnet werden (vgl. Formel I.f). Da ohne Schwerkraft keine Kraft mehr auf die Membran einwirkt, sollte mit dem Stufenübergang, gemäß der Statocystenhypothese, keine Gravikinese mehr nachzuweisen sein. Tatsächlich ist ein Nachlassen der Gravikinese zu beobachten, die vormals richtungsabgängigen Geschwindigkeiten fallen im Verlauf der μ g-Phase zusammen. Diese verzögerte Relaxation weist ebenfalls auf die Beteiligung viskoelastischer Elemente des Cytoskeletes hin (s.o.).

Die plötzliche Änderung der Geschwindigkeiten aufwärts- und abwärts laufender Zellen beim Stufenübergang zeigt den Einfluss der Sedimentationsgeschwindigkeit auf laufende Zellen und rechtfertigt damit die Anwendung der Formeln für die Berechnung der Gravikinese auch für diese Bewegungsform.

Eine Analyse der Bewegungsmuster von *Stylonychia* (Laufen, Reversal, Schwimmen) demonstriert, dass das Verhalten der Zellen in Schwerelosigkeit eher dem von Zellen in horizontal positionierter Versuchskammer entspricht. Dies ist nahe liegend, da sich bei gleicher Verteilung der anterioren und posterioren Rezeptorkanäle die de- und hyperpolarisierenden Gravirezeptorpotentiale aufheben müssten. Dieser in seiner Auswirkung „reizfreie“ Zustand wäre mit einem Aufenthalt der Zelle in Schwerelosigkeit zu vergleichen, wenn kein Druck durch das Cytoplasma auf die unten liegende Membran ausgeübt wird. In einer vertikalen Kammer können, je nach Ausrichtung der Zelle, unterschiedliche Anteile der Rezeptorpopulationen aktiviert werden. Da einige Zellen mit dem anterioren Zellpol nach unten orientiert sind, könnten die daraus resultierenden Depolarisationen zu einer Verschiebung der Häufigkeit spontaner Rück-Vor-Bewegungen führen, was letztlich einen Einfluss auf die Orientierung der Zellen hat. Ein derartiger Trend lässt sich in Abbildung 3.24 erkennen, hält einer statistischen Analyse durch den Chi-Quadrattest allerdings nicht stand. Dadurch wird ein Zusammenhang zwischen der Reversalfrequenz und der Beschleunigung nicht ausgeschlos-

sen. Es ist denkbar, dass der relativ kurze Messzeitraum von 4,75 Sekunden nicht ausreicht, um auf Grund eines Relaxationsprozesses, eine signifikante Abnahme der Reversalfrequenz nachzuweisen.

Es ist aber auch möglich, dass die zu Grunde liegenden Datenzahlen für eine statistische Auswertung nicht ausreichend sind. Ein grundsätzliches Problem der Versuche im Fallturm besteht darin, dass auf Grund der kurzen Messdauer die Datenzahlen, auch bei Verwendung paralleler Ansätze, nicht sehr groß sind. Es ist daher wünschenswert, größere Datenzahlen in Versuchen zu erheben, die denen unter Schwerelosigkeitsbedingungen entsprechen.

4.3.6. Auswirkungen der Zentrifugalbeschleunigung

Wie in 2.3.9 ausgeführt, können unter besonderen Bedingungen (bipolare Mechanorezeptorverteilung) die Zentrifugenversuche in horizontaler Versuchskammer als Simulation von Hypo-g-Bedingungen interpretiert werden. Um die Leistungen eines reizverarbeitenden Systems zu verstehen, ist es hilfreich, die Reizschwelle zu kennen. Durch das Vorliegen einer Schwelle kann im günstigen Fall geklärt werden, inwieweit eine bestimmte Verhaltensweise auf einem physikalischen oder einem physiologischen Mechanismus beruht. Es müsste also ein Beschleunigungswert zu ermitteln sein, bei welchem eine Gravikinese gerade noch nachgewiesen werden kann. Wenn die Graviorientierung nach rein physikalischen Gesetzmäßigkeiten funktioniert, dürfte dagegen keine Schwelle zu finden sein.

Um dies zu überprüfen wurden Zentrifugenexperimente mit *Stylonychia* in horizontal eingebauter Versuchskammer durchgeführt. Anhand der Daten in 3.2.4. konnte gezeigt werden, dass eine horizontal schwimmende Zelle bei 1 g weder eine Graviorientierung noch eine Gravikinese ausbildet. Durch das Drehen der Zentrifuge wirken zwei Beschleunigungsvektoren auf die Zellen ein: die Zentrifugalbeschleunigung und die Erdbeschleunigung. Beide Vektoren addieren sich zu einem resultierenden Beschleunigungsvektor, dessen Betrag größer als 1 g ist. Voraussetzung für diese Versuche ist, dass sich durch die bipolare Rezeptorvertei-

lung bei horizontal orientierten Zellen die Wirkung der Erdbeschleunigung aufhebt und nur die Zentrifugalbeschleunigung wirkt (Bräucker & Machemer, 2002). Der Vorteil, diese Versuche mit *Stylonychia* durchzuführen, besteht darin, dass sich eine auf der Oberfläche laufende Zelle nicht parallel zum resultierenden Beschleunigungsvektor orientieren kann ohne die Oberfläche zu verlassen. Dies wurde bei den verwendeten Beschleunigungen jedoch nicht häufig festgestellt. Die Verteilung der aktivierten Kanäle entspricht demnach bei *Stylonychia* der schematischen Darstellung in Abbildung 2.7.

Bei einer Zentrifugalbeschleunigung kleiner oder gleich 0,3 g konnte keine signifikante Orientierung mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Dieser Befund kann nicht auf eine zu niedrige Datenzahl zurückgeführt werden, da diese für alle Datenpunkten etwa gleich groß ist. Oberhalb einer Beschleunigung von 0,3 g besteht scheinbar ein linearer Zusammenhang zwischen Zentrifugalbeschleunigung und Orientierung. Die Messwerte unterliegen zwar Schwankungen, der Korrelationskoeffizient ist mit 0,96 jedoch relativ groß. Dieser Befund ist unerwartet, da für die Graviorientierung von *Stylonychia* ein physikalischer Mechanismus vermutet wurde (s. 4.3.1.) und daher keine Schwelle vorliegen sollte. Ob es sich bei dem Wert 0,4 g wirklich um den Schwellenwert der Graviorientierung handelt, ist nicht eindeutig zu klären. Wie in den vorausgegangenen Abschnitten bereits erwähnt wurde, wird für *Stylonychia* vermutet, dass eine physikalisch bewirkte Ausrichtung der Zelle durch eine hohe Reversalrate verringert wird. Die Graviorientierung wäre dann das Resultat zweier gegenläufiger Prozesse. Es wäre denkbar, dass unterhalb einer Beschleunigung von 0,4 g die Reversalaktivität im Vergleich zur (reduzierten) physikalischen Ausrichtung überwiegt und dies zu einer Randomisierung der Zellpopulation führt. Da es sich bei der schwerkraftabhängigen Beeinflussung der Reversalrate um einen physiologischen Prozess handelt, kann erwartet werden, dass die Schwelle für eine Gravikinese unterhalb des betreffenden Beschleunigungswertes liegt. Die Signifikanz der Orientierung von *Stylonychia* wurde mit dem Rayleigh-Test überprüft. Mit statistischen Verfahren kann aber

nicht bewiesen werden, dass eine Reaktion auf einen Reiz nicht stattgefunden hat. Man kann also höchstens sagen, dass die Schwelle unterhalb eines bestimmten Wertes liegt, nie aber wo genau. Die Definition einer Schwelle hängt daher von den verwendeten Messmethoden ab.

Unterhalb einer Zentrifugalbeschleunigung von 0,9 g werden die Differenzen der zentrifugalen und zentripetalen Geschwindigkeiten mit der Beschleunigung geringer und lassen sich ab 0,4 g nicht mehr trennen (Abb. 3.20). Dies lässt sich durch die kleiner werdenden Beträge der Sedimentationsgeschwindigkeit und der richtungsabhängigen Gravikinesen erklären.

Um eine Schwelle der Gravikinese nachzuweisen, wurden die Geschwindigkeiten um die jeweiligen, aus den Hyper-g-Versuchen extrapolierten, Sedimentationsgeschwindigkeiten korrigiert (Abb. 3.21). Dies ist zulässig, da für die Sedimentationsgeschwindigkeit ein linearer Zusammenhang mit der Beschleunigung nachgewiesen wurde. Die Extrapolation der richtungsabhängigen Geschwindigkeitsdaten auf 0 g Zentrifugalbeschleunigung (horizontal laufende Zellen, bei stehender Zentrifuge) ergibt einen schwerkraftunabhängigen Vortrieb von 988 $\mu\text{m/s}$. Die Differenz der korrigierten Geschwindigkeiten zum schwerkraftunabhängigen Vortrieb stellen die richtungsabhängigen Gravikinesen dar und sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Dabei ist auffällig, dass die Kinese der in zentrifugaler Richtung laufenden Zellen ab einer Beschleunigung kleiner als 0,4 g konstant bleibt.

Da P innerhalb des Konfidenzbereiches der Geschwindigkeitsdaten liegt (Abb. 3.21), kann angenommen werden, dass sich die Geschwindigkeiten in einem Bereich kleiner als 0,4 g statistisch nicht mehr von P trennen lassen. Damit läge die Schwelle für die Gravikinese der in zentrifugaler Richtung laufenden Zellen unterhalb von 0,5 g Zentrifugalbeschleunigung. Die Gravikinese der in zentripetaler Richtung laufenden Zellen nimmt mit sinkender Beschleunigung ab. Dies entspricht den Forderungen, die sich aus der Statocystenhypothese ergeben. Die Schwelle der Gravikinese der in zentripetaler Richtung laufenden Zellen liegt wie die Schwelle der generalisierten Gravikinese unterhalb von 0,1 g Zentrifugalbe-

schleunigung. Bei *Paramecium caudatum* konnte mit Hilfe dieser Methode ein Schwellenwert für die Gravikinese von $\leq 0,05$ g ermittelt werden (Watzke, 2000).

Neben den oben bereits erwähnten Punkten gibt es noch weitere Argumente, die die Zuverlässigkeit einer Schwellenwertbestimmung anhand der dargestellten Methode einschränken. Die untersuchten Zellen befinden sich nicht unter realen Hypogravitationsbedingungen und zu keinem Zeitpunkt in einem reizfreien Zustand. Dadurch, dass die resultierende Beschleunigung oberhalb von 1 g liegt, werden die Zellen in bestimmten Membrangebieten gereizt. Die ermittelten Schwellen haben daher nur unter den dargestellten Versuchsbedingungen Gültigkeit.

Die hier für die Gesamtpopulation bestimmte Reizschwelle unterliegt interindividuellen Schwankungen. Es kommen durch den variablen Erregungszustand der Zelle intraindividuelle Schwankungen hinzu. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Schwellen mehrmals zu bestimmen und mit statistischen Verfahren zu ermitteln. Um den Effekt einer möglichen Adaptation an bestehende Reizstärken zu verhindern, ist es zudem sinnvoll, die Reizschwelle von zwei Seiten durch auf- und absteigende Reizstärken einzugrenzen.

Es scheint daher erforderlich, die bei *Stylonychia* erhobenen Befunde unter μ g- bzw. Hypo-g-Bedingungen zu verifizieren. Dazu geeignet sind beispielsweise Parabelflüge mit kontinuierlichen Beschleunigungsänderungen zwischen 1,8 g und 0 g. In der Vergangenheit wurden mit *Paramecium* Zentrifugenversuche unter μ g-Bedingungen durchgeführt (Hemmersbach-Krause et al. 1993b). Dabei konnte für die Graviorientierung eine Schwelle zwischen 0,16 g und 0,32 g, für die Gravikinese bei 0,35 g bestimmt werden (Hemmersbach et al., 1996; Hemmersbach, 1997). Die Wahrnehmung derartig niedriger Reizintensitäten unterstützt die bereits diskutierten Verstärkungsmechanismen auf cytoskeletaler Ebene.

4.3.7. Schwerkraftunabhängiger Vortrieb

Durch Versuche bei verschiedenen Beschleunigungen konnte der schwerkraftunabhängige Vortrieb (P) von *Stylonychia* abgeschätzt werden (s.o.). Tabelle 4.1 stellt diese Werte aus dem Ergebnisteil noch einmal vergleichend dar.

Tab. 4.1: Durch verschiedene Methoden ermittelte Werte für den schwerkraftunabhängigen Vortrieb (P). Wahrscheinlich entspricht ein Wert von 931 $\mu\text{m/s}$ am ehesten dem „wahren“ P-Wert (s. Text).

P [$\mu\text{m/s}$]	Methode der Bestimmung
931	Fallturmversuche (Extrapolation aus μg)
1012	Hypergravitationsversuche (Extrapolation auf 0 g)
993	1 g Horizontal-Laufgeschwindigkeit (vertikale Kammer)
973	1 g Horizontal-Laufgeschwindigkeit (horizontale Kammer)
988	Versuche unter Zentrifugalbeschleunigung (Extrapolation auf 0 g)

Der aus den Fallturmversuchen berechnete Wert kommt dem wahren P-Wert wohl am nächsten, da er unter den Bedingungen echter Schwerelosigkeit erhoben wurde. Die Werte aus den beiden Zentrifugenversuchsreihen sind durch Extrapolation auf 0 g bestimmt worden, wobei durch die Versuche bei Zentrifugalbeschleunigung der P-Wert anscheinend genauer bestimmt werden kann, da er dem μg -Wert eher entspricht als der Wert aus den Hypergravitationsversuchen. Die Daten aus der vertikalen und horizontalen Versuchskammer sind bei 1 g leicht erhöht. Daraus ist zu schließen, dass Zellen bei 1 g gegenüber Zellen in Schwerelosigkeit leicht hyperpolarisiert sind. Dieser Befund steht im Einklang mit den später dargestellten elektrophysiologischen Ergebnissen.

4.3.8. Nachwirkungen erhöhter Beschleunigung

Die Schwerkraftwahrnehmung eines Ciliaten kann direkt anhand der Veränderung seines Bewegungsverhaltens analysiert werden. Die in 3.2.6. beschriebenen Experimente sollten klären, ob eine kurzfristige Erhöhung der Schwerkraft eine nachhaltige Wirkung auf das Lokomotionsverhalten von *Stylonychia* hat.

Sowohl die Graviorientierung (Abb. 3.19) als auch die Gravikinese (Abb. 3.18) sind mit steigender Beschleunigung im Vergleich zu den Kontrollwerten vor der Zentrifugation (1 g) erhöht. Dies deckt sich mit den bereits beschriebenen Daten (3.2.5.). Nach dem Abbremsen der Zentrifuge erreicht die Präzision der Orientierung bei allen g-Stufen innerhalb von drei Minuten wieder den Ausgangswert (Kontrollwert vor der Zentrifugation).

Da für die Ausrichtung von *Stylonychia* ein physikalischer Prozess angenommen wird, müsste die erhöhte Beschleunigung die Zellform beeinflussen, um so eine nachhaltige Änderung des Orientierungsverhaltens zu induzieren. Dies war bei den gewählten Beschleunigungsprofilen anscheinend nicht der Fall.

Auch die Gravikinese erreicht nach der Zentrifugation wieder die ursprünglichen Werte. Die bei 3 g nach der Zentrifugation gemessene Erhöhung der Differenz zwischen auf- und abwärtslaufenden Zellen konnte bei anderen Beschleunigungen nicht gefunden werden. Die anfangs niedrige Geschwindigkeit in den Versuchen bei stehender Zentrifuge (1 g) kann darauf zurückgeführt werden, dass die Versuchskammer kurz vor der Aufnahme in die vertikale Position gedreht wurde. Dies führt scheinbar zu einer zeitlich verzögerten Erhöhung der Fortbewegungsgeschwindigkeiten, was ansatzweise auch in den vorausgegangenen Versuchen bei erhöhter Beschleunigung zu erkennen ist.

Bei *Stylonychia* konnte keine nachhaltige Veränderung des Bewegungsverhaltens durch eine zweiminütige Beschleunigungsphase nachgewiesen werden. Dies ermöglicht eine Messung mit variablen Beschleunigungsprofilen, wie sie bei Parabelflügen vorliegen.

Dabei ist zu bedenken, dass es neben der Lokomotion jedoch auch andere zelluläre Prozesse gibt, die direkt oder indirekt durch die Schwerkraft beeinflusst werden und sich zunächst nicht im Fortbewegungsverhalten widerspiegeln. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Prozesse, die eine längerfristige Exposition von erhöhten oder erniedrigten Beschleunigungen voraussetzen. Bei verschiedenen

Zellsystemen konnte eine Veränderung der Teilungsrate nachgewiesen werden (Cogoli & Cogoli-Greuter, 1997). Die Modifikation cytoskeletaler Elemente und deren Involvierung in die Gravitransduktion (Lewis, 2002) wird durch Befunde gestützt nach denen die Selbstorganisation von Mikrotubuli ein schwerkraftabhängiger Prozess ist (Tabony et al., 2002).

Durch Experimente langandauernder Beschleunigungsänderungen könnten Fragen zur Beeinflussung des Öffnungsverhaltens oder der Neubildung der an der Gravitransduktion beteiligten Kanäle geklärt werden. Durch derartige Versuche könnte auch geklärt werden, ob Ciliaten in der Lage sind an den Schwerkraftreiz zu adaptieren. Eine Adaptation würde die Reizschwelle verschieben und damit die Empfindlichkeit gegenüber variierten Beschleunigungen erhöhen. Da die Zellen unter natürlichen Bedingungen selten erhöhten Beschleunigungen ausgesetzt sind, wäre ein derartiger Adaptationsprozess für die Wahrnehmung normaler Erdbeschleunigung eher kontraproduktiv.

4.3.9. Stoßversuche

Eine punktförmige mechanische Reizung der Zellmembran führt bei Ciliaten auf Grund der Aktivierung mechanosensitiver Kanäle zur Veränderung des Membranpotentials. Die Untersuchung der Frage, wie sich die gleichzeitige Aktivierung vieler dieser Kanäle auswirkt wäre durch elektrophysiologische Messverfahren nur schwierig durchführbar. Einfacher ist es die Zellen durch eine Verschiebung der umgebenden Flüssigkeit stoßartig zu reizen und die resultierende Verhaltensantwort zu analysieren.

Diese Reizbedingung führt bei *Stylonychia* zunächst zu einer Erniedrigung der Laufgeschwindigkeit (Abb. 3.9). Die Zellen werden offenbar depolarisiert. Da durch die Reizung beide Gruppen von Mechanorezeptorkanälen angesprochen werden und sich die Potentialänderungen addieren, kann davon ausgegangen werden, dass die depolarisierenden Calcium-Mechanorezeptorkanäle stärker zu Änderung des Membranpotentials beitragen. Nach den zwei- oder dreifachen Reizen

hält die Depolarisation mindestens zwei Minuten an. Bei der einmaligen Reizung klingt die Aktivierung der Calcium-Mechanorezeptorkanäle schneller ab. Da die Zellen nach etwa einer Minute ihre Geschwindigkeit wieder erhöhen, scheint die zur Hyperpolarisation führende Aktivierung der posterioren Kalium-Mechanorezeptorkanäle nachhaltiger als die der Calcium-Mechanorezeptorkanäle zu sein.

Die quantitative Verteilung der Mechanorezeptorkanäle hängt von der untersuchten Species ab. Bei *Paramecium* führt eine allseitige Reizung der Zelle zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer Erhöhung der Fortbewegungsgeschwindigkeit (eigene Beobachtung). Anhand der elektrophysiologischen Untersuchungen konnte bei *Stylonychia* gezeigt werden, dass die Transmembranströme nach einer posterioren Reizung höher sind, als bei einer Reizung des anterioren Zellpols (3.3.4.). Die allseitige Reizung führt jedoch dazu, dass durch das anterior induzierte Rezeptorpotential spannungsabhängige Calciumkanäle aktivieren und die Depolarisation verstärkt wird.

Der Stoßreiz ist dazu geeignet, die mechanische Empfindlichkeit einer Kultur zu überprüfen. Bei den verhaltensphysiologischen Versuchen treten derartige mechanische Reizsituationen allerdings selten auf. Dies liegt daran, dass sich in geschlossenen Kammern auf Grund der Inkompressibilität des Mediums mechanische Stöße schlecht ausbreiten können, was auch durch entsprechende Versuche an *Paramecium* gezeigt werden konnte (pers. Mitteilung R. Bräucker).

Durch die Anwendung verhaltensphysiologischer Versuchsmethoden ist es möglich Aussagen über die Fortbewegung einer großen Anzahl von Zellen in Bezug auf die Schwerkraft zu machen. Dabei können die Parameter Orientierung und Fortbewegungsgeschwindigkeit mit der Reizrichtung und Reizstärke korreliert werden. Um Aussagen über die Reiztransduktion und den Ort der Reizaufnahme zu machen sind diese Experimente nicht hinreichend geeignet. Daher ist es notwendig, auf die Untersuchungsmethoden der intrazellulären Elektrophysiologie zurückzugreifen.

4.4. Elektrophysiologie von *Stylonychia mytilus*

In den folgenden Kapiteln werden die Daten der elektrophysiologischen Untersuchungen an *Stylonychia mytilus* diskutiert. Dabei wird zunächst auf die elektrischen Eigenschaften der Versuchszellen eingegangen. Die erhobenen Daten zur Mechanosensitivität und die Ableitung von Gravirezeptorpotentialen untermauern Ergebnisse aus den verhaltensphysiologischen Experimenten. Die Kernfragen lauten: Sind die mechanosensitiven Kanäle so auf dem Soma verteilt, dass die Schwerkraftwahrnehmung gemäß der Statocystenhypothese ablaufen kann und lassen sich die aus der Hypothese geforderten Gravirezeptorpotentiale nachweisen?

4.4.1. Durchführung der Messungen

In der Literatur sind zahlreiche elektrophysiologische Daten zu *Stylonychia mytilus* zu finden (vgl. Machemer & Deitmer, 1987). Die dabei verwendeten Methoden gehen auf Untersuchungen von Naitoh und Eckert (1972) zur Elektrophysiologie von *Paramecium caudatum* zurück und sind gut etabliert. Da die erhobenen Daten teilweise Jahrzehnte zurückliegen und an anderen Zell-Klonen gemessen wurden, erschien es notwendig, die elektrischen Eigenschaften der verwendeten Zell-Linie neu zu vermessen. So konnte sichergestellt werden, dass z.B.

die Befunde zur spannungsabhängigen Steuerung der Cirrenaktivität (1.2.2.) auch für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen gelten.

Die durchgeführten Messungen wurden an einer großen Zellzahl (Konstantstrominjektion: 60, Spannungsklemme: 40) vorgenommen, so dass erstmals für *Stylonychia* auch statistische Auswertungen der elektrischen Membraneigenschaften durchgeführt werden konnten.

4.4.2. Elektrophysiologische Eigenschaften von *Stylonychia*

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen stimmen zum Großteil mit denen früherer Experimente überein. Tabelle 4.1 stellt die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte den Literaturwerten gegenüber.

Tab. 4.2: Vergleich der physiologischen Daten aktueller und früherer Messungen an *Stylonychia mytilus*.

Parameter	Messwert	Literaturwert	Quelle
Membranpotential	-44 mV	-48 mV	de Peyer & Machemer, 1977
Eingangswiderstand	21 MΩ	33 bis 100 MΩ	Machemer & Deitmer, 1987
Zeitkonstante	39 ms	40 bis 80 ms	Deitmer, 1982
Eingangskapazität	1,9 nF	1 nF	(berechnet)
spez. Membranwiderstand	42,5 kΩ/cm ²	220 kΩ/cm ²	Machemer & Deitmer, 1987
spez. Membrankapazität	0,9 μF/cm ²	0,3 μF/cm ²	Machemer & Deitmer 1987

Der Eingangswiderstand der Zelle wird im Ruhezustand hauptsächlich durch Kaliumkanäle in der Somamembran bestimmt. Die Membran der Cilien und Cirren trägt bei *Stylonychia* zwar mit etwa 70% zur Gesamtmembranfläche bei (vgl. 3.1.), hat aber, auf Grund der im Ruhezustand geschlossenen Calciumkanäle, einen sehr hohen Widerstand, so dass der Gesamteingangswiderstand der Zelle durch diese Membranbereiche nicht beeinflusst wird. Die Abweichungen in den aktuell und früher gemessenen (mittleren) Eingangswiderstandsdaten können nicht auf die unterschiedlichen Zellgrößen zurückgeführt werden, da die im Rahmen dieser Arbeit vermessenen Zellen kleiner sind als die in früheren Untersu-

chungen (Machemer & Deitmer, 1987), so dass der Eingangswiderstand eher höher sein müsste. Der Unterschied wird durch einen Vergleich der Daten des spezifischen Widerstandes deutlich: anscheinend sind bei den aktuell vermessenen Zellen im Ruhezustand mehr Kanäle geöffnet. Eine durch das Einstechen der Elektroden verursachte Verletzung der Zellen kann auf Grund der hohen Datenzahlen ausgeschlossen werden. Die Messungen der Zeitkonstanten entsprechen dem Wert, der für biologische Membranen allgemein angenommen wird (1 nF, Eckert & Randall, 1986). Dies spricht für die Zuverlässigkeit der durchgeführten Abschätzung der Membranoberfläche (3.1.).

Durch die Injektion positiver Konstantstromreize konnten Aktionspotentiale ausgelöst werden, die aus zwei Komponenten bestehen (3.3.1.). Die gradierte Komponente entspricht dem Aktionspotential, das auch bei *Paramecium caudatum* gemessen werden kann (Naitoh et al., 1972). Da die Alles-oder-Nichts-Komponente zeitlich verzögert erscheint (60 ms, Abb. 3.32) und eine nicht von der Reizstärke abhängende Amplitude hat, lässt sie sich schwer von der späten Spannungsänderung trennen. In dieser Hinsicht war es problematisch, dass die gewählte Reizdauer im Vergleich zu früheren Messungen relativ kurz war (80 ms). Längere Pulsdauern wurden von den Zellen jedoch schlecht toleriert, so dass sich bereits nach wenigen Pulsen Membranbereiche aus der Zelle herauslösten oder das adorale Membranellenband abgestoßen wurde.

Anhand der Strom-Spannungskennlinien kann die spannungsabhängige Aktivierung von Ionenkanälen untersucht werden. Im Bereich kleiner Stromreize verhält sich die Membran wie ein ohmscher Leiter. Bei positiven Stromreizen werden neben den beiden Typen der spannungsabhängigen Calciumkanälen auch zwei auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle aktiviert, die zu einer Repolarisation der Membran beitragen. Dabei handelt es sich um einen schnell aktivierenden Kaliumkanal und um einen verzögert aktivierenden, calciumabhängigen Kaliumkanal, die sich beide auf dem Soma befinden (Machemer & Deitmer, 1987). Starke Hyperpolarisationen führen ab einer Amplitude von etwa -30 mV zur Aktivierung

einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle, die zu einer Wiederherstellung des Ruhepotentials beitragen. Da sich die ermittelten Kennlinien von denen früherer Messungen (de Peyer & Machemer, 1977) nicht wesentlich unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Ausstattung an spannungsabhängigen Kanälen zwischen den verschiedenen Zell-Linien die gleiche ist.

In der Spannungsklemme wird die Zelle auf dem Ruhepotential gehalten, so dass kein Nettostromfluss über die Membran gemessen werden kann. Frühere Beobachtungen, nach denen die ventralen Cirren während des Ruhepotentials inaktiv sind, konnten bestätigt werden. Einzelne Cirren zeigten zum Teil ein langsames, unkoordiniertes Schlagen, was bei einer freien Zelle kaum zu einer Laufbewegung führen kann. Hieraus kann nur geschlossen werden, dass sich aktiv vorwärts bewegende Stylonychien hyperpolarisiert sind.

Die verwendeten Versuchszellen zeigten bei positiven Spannungspulsen eine Aktivierung früher Einstöme. Dabei handelt es sich um die bereits erwähnten beiden Typen von Calciumkanälen. Die Amplitude des niederschwellig (ab Depolarisation von 3 mV) aktivierenden Calciumionenstromes betrug etwa -4 nA, die des spät aktivierenden Calciumionenstromes im Median -17 nA. Damit sind die gemessenen Stromamplituden geringer, als die veröffentlichten Werte. Deitmer (1986) konnte in gleicher Versuchslösung maximale Einstöme von 7,5 nA bzw. -36,5 nA messen. Die aktuell gemessenen Daten gehen auf eine höhere Zellzahl zurück. Die Abweichungen in den Stromstärken lassen sich durch die verwendeten Zelllinien erklären. In früheren Messungen wurden oft neu klonierte Zellen verwendet, um möglichst ein einheitliches Ergebnis bei den Messungen zu erhalten. Bei den aktuellen Messungen wurden Zellen aus verschiedenen Kulturansätzen (und verschiedenen Klonen) genommen, um möglichst, auch in Hinsicht auf die verhaltensphysiologischen Experimente, die Variabilität innerhalb der Population darzustellen. Dies führt bei den aktuellen Daten zu höheren Streuungen, aber auch dazu, dass die ermittelten Mediane von den Literaturdaten abweichen.

Die Abweichungen zwischen den Messungen und den Literaturdaten in Bezug auf die frühen Einstürze und den niedrigeren Eingangswiderstand sind eventuell auch auf das Alter der Zellkulturen (Alter als Zeitpunkt von der Klonierung an betrachtet) zurückzuführen (pers. Mitteilung M. Weskamp). Die bei den aktuellen Messungen verwendeten Kulturen wurden vor 8 Jahren kloniert. Es ist möglich, dass sich das Alter einer Kultur in einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Reizungen (niedriger Eingangswiderstand) bemerkbar macht.

Ansonsten scheinen die elektrischen Eigenschaften der verwendeten Zellen keine nennenswerten Unterschiede zu denen früherer Messreihen zu zeigen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Elektrophysiologie von Ciliaten innerhalb einer Art weitestgehend determiniert ist.

4.5. Mechanosensitivität von *Stylonychia*

4.5.1. Anordnung der mechanosensitiven Kanäle

Stylonychia mytilus zeigt eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Reizen. Die auf eine Reizung folgenden Membranströme sind, vor allem im anterioren Bereich, deutlich größer als bei *Paramecium* (vgl. Ogura & Machemer, 1980). Aus der Literatur sind bisher nur Daten über die Mechanosensitivität bei lateraler Reizung bekannt (de Peyer & Machemer, 1978). Auf Grund der komplexen Zellform von *Stylonychia* wäre es denkbar, dass die ventralen oder dorsalen Membranbereiche Abweichungen von einer gleichmäßigen bipolaren Kanalverteilung zeigen. Bei *Bursaria truncatella* wurden auf der ventralen Zellseite vorwiegend hyperpolarisierende Rezeptorkanäle entdeckt, während die dorsale Zellseite eine bipolare Verteilung von Kanälen aufweist (Krause, 1999). Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen dorsaler und ventraler Membran konnten auch bei *Paramecium* nachgewiesen werden (Ogura & Machemer, 1980). Bei *Stylonychia* würde eine derartige Verteilung sehr wahrscheinlich Auswirkungen auf das

schwerkraftabhängige Bewegungsverhalten haben, da dadurch eine horizontal laufende Zelle gegenüber einer Zelle unter μg -Bedingungen hyperpolarisiert wäre.

Die durchgeführten Experimente zeigen zwar, dass die bei lateraler Reizung gefundene bipolare Verteilung der Mechanorezeptorkanäle für die gesamte Oberfläche gilt, dass aber, bei gleicher Entfernung vom posterioren Zellpol, eine mechanische Reizung der verschiedenen Zellseiten (lateral, ventral, dorsal) zu unterschiedlich hohen Potentialänderungen führt (Abb. 3.40).

Frühere Messungen ergaben, dass die Amplitude der Membranpotentialänderung sowohl von der Auslenkungsstrecke als auch von der Geschwindigkeit des Stimulators abhängt (de Peyer & Machemer, 1978). Da in der vorliegenden Arbeit beide Parameter konstant gehalten wurden, sind die gemessenen Unterschiede der Amplitude wahrscheinlich auf unterschiedliche Kanaldichten an den jeweiligen Reizorten zurückzuführen.

Die höhere Amplitude bei anteriorer Reizung beruht darauf, dass das durch die Reizung ausgelöste Rezeptorpotential zu einer spannungsabhängigen Aktivierung der niederschwelligen Calciumkanäle führt. Dadurch wird ein Aktionspotential ausgelöst, dessen graduierte Komponente vermessen wurde. Die während der Spannungsklemme, nach einer mechanischen Reizung gemessenen Ströme verdeutlichen jedoch, dass die Zelle empfindlicher für Stimulationen des posterioren Zellpols ist.

Auf der dorsalen Membranseite wird die maximale Amplitude, anders als auf der ventralen und lateralen Membranseite, nicht durch eine Reizung im äußersten anterioren Sektor hervorgerufen. Eine mögliche Erklärung für diese verschobene Kanalverteilung auf der dorsalen Seite konnte nicht gefunden werden.

Wie auch bei früheren Messungen an *Paramecium* (Ogura & Machemer, 1980) konnte, auf Grund der vorliegenden Daten, eine Beteiligung der Cirren an der Mechanotransduktion bei *Stylonychia* ausgeschlossen werden. Reizungen an einer Stelle im ventralen anterioren Zellbereich, die frei von Cirren ist, riefen ebenso

Rezeptorpotentiale hervor, wie Reizungen an anderen Stellen. Eine direkte Berührung der Cirren führte auch zu keiner Veränderung des Membranpotentials. In einigen Fällen konnte jedoch beobachtet werden, dass die Zelle dem Stimulator auswich, obwohl dieser die Membran nicht berührte. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Zelle Veränderungen in dem durch die Cirren verursachten Strömungsfeld wahrnimmt.

Über den molekularen Aufbau der an der Reiztransduktion beteiligten Kanäle ist nichts bekannt. Eine erfolgreiche Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten blieb, auf Grund der komplexen Zelloberfläche, bei Ciliaten bisher erfolglos.

4.5.2. Auswirkungen der Kanalverteilung auf das Bewegungsverhalten

Die Verteilung der mechanosensitiven Kanäle bei *Stylonychia* entspricht weitgehend der bei *Paramecium*, so dass die Voraussetzungen für eine Übertragbarkeit der Statocystenhypothese gegeben sind. Durch die Kraft des Cytoplasmas wird entsprechend der Hypothese die Zellmembran nach außen deformiert. Dies führt über die Aktivierung von Mechanorezeptoren und die elektromotorische Kopplung zur Ausbildung einer Gravikinese. Bei den Untersuchungen zur Mechanosensitivität der Zellen wurde die Zellmembran durch den Stimulator jedoch nach innen gedrückt und so ein Rezeptorpotential ausgelöst. Diese Diskrepanz führt zu folgenden unterschiedlichen Überlegungen:

- Die mechanosensitiven Kanäle unterscheiden sich von den gravisensitiven Kanälen.
- Es gibt keinen Unterschied zwischen den Kanaltypen, sowohl nach innen als auch nach außen gerichtete Deformationen führen zu einer Kanalöffnung
- Es gibt keinen Unterschied zwischen den Kanaltypen, bei der lokalen mechanischen Reizung entsteht das Rezeptorpotential nicht bei der Einwärtsdeformation, sondern bei der Rückkehr der Membran in den Ausgangszustand.

Die letzte Überlegung wird durch Messungen der Latenzzeit nach punktförmiger Reizung bei *Paramecium caudatum* unterstützt (Machemer & Machemer-Röhnisch, 1984). Einige Autoren gehen davon aus, dass die Kanäle, die zur Graviperzeption aktiviert werden, spezialisierte, mit Elementen des Cytoskeletes verbundene Mechanorezeptorkanäle sind (s.o.).

Um die Auswirkung der gemessenen Amplituden auf das Bewegungsverhalten zu analysieren, wird angenommen, dass diese spezialisierten Kanäle innerhalb der Gruppe aller mechanosensitiven Kanäle an jeder Stelle der Membran gleich häufig vorkommen.

Da die Transmembranströme und die Rezeptorpotentiale (ohne Aktionspotentiale) bei posteriorer Reizung in allen Membranbereichen höher sind als bei anteriorer Reizung, müsste eine Zelle bei 1 g gegenüber einer Zelle unter Schwerelosigkeitsbedingungen hyperpolarisiert sein. Dies würde erklären, warum die in μg gemessenen Vortriebsgeschwindigkeiten P (Tab. 4.1) niedriger sind als die jeweiligen Horizontallaufgeschwindigkeiten bei 1 g. Eine Reizung des anterioren Zellpols führt immer zu Aktionspotentialen. Die Vermutung, dass die Fluktuation des Membranpotentials und die hohe Frequenz von Rück-Vor-Bewegungen auch auf die schwerkraftabhängige Aktivierung von depolarisierenden Rezeptorkanälen zurückzuführen ist, konnte durch die Fallturmversuche nicht bestätigt werden. Dies schließt diesen Mechanismus jedoch nicht aus, da die kurze μg -Zeit eventuell nicht ausreichend war, um diesen Effekt nachzuweisen. Hier könnten Versuche in länger anhaltender Schwerelosigkeit (Parabelflüge) genauere Ergebnisse erzielen.

Eher unwahrscheinlich ist, dass eine Drehung der Zelle um ihre Längsachse beim Schwimmen auf einer helikalen Bahn zur Veränderung des Membranpotentials führt, da eine Verminderung der posterioren Rezeptorpotentiale immer in gleicher Weise mit einer Erniedrigung der anterioren Rezeptorpotentiale einhergeht (Abb. 3.40).

4.6. Gravirezeptorpotentiale

Stylonychia mytilus erscheint aus zwei Gründen für die Messung von Gravirezeptorpotentialen geeignet: Zum einen ist die Zelle mechanisch sehr sensibel, zum anderen handelt es sich um einen relativ großen Ciliaten, dessen cytoplasmatische Masse für die Reiztransduktion entsprechend der Statocystenhypothese groß genug erscheint (vgl. 4.3.2.).

4.6.1. Messung der schwerkraftabhängigen Potentialänderungen

An *Stylonychia mytilus* konnten in Abhängigkeit von der Ausrichtung der Zelle zum Schwerkraftvektor unterschiedliche Membranpotentialänderungen gemessen werden. Bei diesen Potentialänderungen handelt es sich daher mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Gravirezeptorpotentiale. Die Korrelation zwischen einer Drehung in Richtung „anterior unten“ bzw. „posterior unten“ und einer Depolarisation bzw. Hyperpolarisation entspricht den Voraussagen der spezialisierten Statocystenhypothese und unterstützt diese. Frühere Messungen an *Paramecium* haben erste Hinweise erbracht, dass eine Messung derartiger Potentiale möglich ist, auch wenn die ermittelten Potentialänderungen gering sind (1,5 mV, Gebauer et al., 1999; 4 mV, in der vorliegenden Arbeit).

Andererseits war eine große Potentialänderung auch nicht zu erwarten, da sonst bei einer abwärtsschwimmenden Zelle eine Umkehr des Cilienschlages und damit eine anhaltenden Rückwärtsfortbewegung hervorgerufen würde.

Eine Abschätzung der Genauigkeit gemessener Potentialänderungen kann durchgeführt werden, wenn ein Parameter gefunden wird, der sowohl die Fortbewegungsgeschwindigkeit als auch das Membranpotential beeinflusst. Durch Variation der externen Kaliumionenkonzentration konnten de Peyer und Machemer (1977) bei *Stylonychia* eine Verschiebung des Membranpotentials von etwa 3,5 mV/mM messen. Messungen der Fortbewegungsgeschwindigkeiten horizontal laufender Stylonychien bei variiert externer Kaliumkonzentration (eigene Daten,

nicht gezeigt) ergaben bei einer Verschiebung von 1 mM eine Veränderung um 196 $\mu\text{m/s}$. Hieraus ergäbe sich pro mV Membranpotentialänderung eine Geschwindigkeitsänderung von 56 $\mu\text{m/s}$. Dabei sei angenommen, dass die elektromotorische Kopplung in dem betrachteten Bereich einen linearen Zusammenhang zwischen Potentialänderung und Cirrenschlagfrequenz bewirkt. Die durch die Reorientierung der Zelle verursachte Potentialänderung führt demnach zu einer Geschwindigkeitsänderung, die in etwa den richtungsabhängigen Gravikinesen entspricht. Ähnliche indirekte Beweise konnten bei *Paramecium* auch durch den Vergleich der spannungsabhängigen Cilienschlagfrequenz mit der Schwimgeschwindigkeit erbracht werden (Gebauer, 2000).

Die Potentialänderungen, die durch eine punktförmige mechanische Reizung der Membran verursacht werden (3.3.4.), sind etwa um den Faktor 10 höher als die gemessenen Gravirezeptorpotentiale. Dies könnte zum einen auf die höhere Geschwindigkeit und Auslenkung des Stimulators zurückgeführt werden. Es scheint jedoch andererseits auch so, dass die Anzahl der Kanäle, deren Öffnung ein Gravirezeptorpotential induziert, gering ist. Bei TEA-behandelten Paramecien wurde die Anzahl der durch eine 180°-Drehung aktivierten Kanäle auf unter 20 geschätzt (Gebauer et al., 1999). Bei *Stylonychia* hängt das Membranpotential, wie bei anderen Ciliaten auch, von den Gleichgewichtspotentialen für Kaliumionen und Calciumionen ab (E_K : -90 mV, E_{Ca} : 116 mV, de Peyer & Machemer, 1977). Bei einem Membranpotential von -42 mV ergibt sich ein Leitwertverhältnis von g_{Ca}/g_K von 0,3 (Gleichung I.b). Bei einer Drehung von „anterior unten“ nach „posterior unten“ (Amplitude -4 mV) ändert sich das Membranpotential, weil sich K^+ -Kanäle öffnen und Ca^{2+} -Kanäle schließen. Unter Berücksichtigung des Eingangswiderstandes von etwa 21 M Ω und einer angenommenen mittleren Kanal-leitfähigkeit von 30 pS (bei Haarsinneszellen liegen Leitwerte von 10 - 50 pS vor, Howard et al., 1988) kann abgeschätzt werden, wie viele Kanäle an der Reiztransduktion beteiligt sind. Bei einer Hyperpolarisation von -4 mV können maximal 40 Calciumionenkanäle oder maximal 150 Kaliumionenkanäle öffnen. Gemäß der

Hodgkin-Horowicz-Gleichung führen bei *Stylonychia* relativ geringe Änderungen von g_{Ca} zu hohen großen Änderungen des Membranpotentials, da das Gleichgewichtspotential für Calciumionen stark positiv ist. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Zelle im anterioren Zellbereich nur wenige gravisensitive Ca^{2+} -Kanäle benötigt, um ein Rezeptorpotential zu generieren. Dies würde die Unterschiede in den Stromamplituden nach lokaler mechanischer Reizung erklären. Die Dichte der Rezeptorkanäle am posterioren Zellpol muss offenbar größer als die Rezeptorkanaldichte am anterioren Zellpol sein. Diese Annahmen gelten nur für *Stylonychia* und unter der Annahme, dass an den jeweiligen Zellpolen nur eine Kanalspezies vorhanden ist.

Ob die für die Potentialänderung erforderliche Kraft durch die Masse des Cytoplasma oder durch andere Zellorganellen hervorgerufen wurde, konnte nicht abschließend untersucht werden. Monzer (1996) konnte bei dem Basidiomyceten *Flammulina velutipes* zeigen, dass der Zellkern, im Zusammenwirken mit dem Cytoskelett auf die unten liegende Membran sedimentiert. Bei *Stylonychia* konnte nach einem Zurückdrehen der Zelle in die Ausgangslage keine Lageveränderung des anterioren Zellkerns festgestellt werden. Ferner wurden auch Gravirezeptorpotentiale gemessen, obwohl der hintere Nukleus durch die Elektroden fixiert wurde. Eine unterstützende Beteiligung der Zellkerne bei der Gravitransduktion konnte damit für *Stylonychia* weitestgehend ausgeschlossen werden.

Bei der Beurteilung der gemessenen Potentialänderungen muss die Frage gestellt werden, ob diese wirklich auf die Wirkung der Schwerkraft zurückzuführen sind. Faktoren, die zu einer Fehlinterpretation führen, müssten eine ähnliche Gerichtetheit aufweisen wie die Schwerkraft und auch in Abhängigkeit von der Drehrichtung die gleiche Art von Potentialänderung hervorrufen. Hier wären zwei Parameter denkbar, die mit der unverzichtbaren Mikroskopbeleuchtung zusammenhängen: Licht- und Temperaturgradienten.

Lichteinfluss

Viele Ciliaten reagieren auf Licht. Bei *Paramecium bursaria* (ohne Chlorellen) wurde durch Experimente mit einem Lichtfleck festgestellt, dass der photosensitive Bereich auf den anterioren Ventralbereich beschränkt ist. Als Photopigment wird Rhodopsin diskutiert (Nakaoka et al., 1989, 1991). Photorezeptorpotentiale hatten bei einer Lichtstärke von $0,7 \text{ W/m}^2$ eine Amplitude von $0,5 \text{ mV}$, ihre maximale Amplitude erreichten sie etwa 500 ms nach Beginn der Reizung (Nakaoka et al., 1987).

Bei *Stylonychia* wurden bisher keine systematischen Untersuchungen zur Photo-rezeption veröffentlicht. Um genaue Aussagen machen zu können, müssten Versuchsreihen zur Messung der Wellenlängen- und Intensitätsabhängigkeit möglicher Rezeptorpotentiale durchgeführt werden, was den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde. Es ist aber bekannt, dass *Stylonychia* in einer horizontalen Versuchskammer bei einer stufenförmigen Änderung der Belichtungsstärke ($>100 \text{ W/m}^2$) eine Erhöhung der Reversalfrequenz zeigt, was auf eine (Photo-) Depolarisation hindeutet (pers. Mitteilung Bräucker, eigene Beobachtungen.). Damit die Zelle ähnlich wie bei der Gravirezeption eine von der Richtung der Reizquelle abgängige Photoreaktion zeigen könnte, müsste zur Entstehung des Photorezeptorpotentials ein lichtsensitiver Bereich beschattet werden. Ein solches System ist das Lieberkühnsche Organell bei *Ophryoglena catenula* (Kuhlmann, 1993).

Bei *Stylonychia* wurde bisher keine ähnliche Struktur gefunden. Um dennoch mögliche Lichteffekte auszuschließen, wurde die Mikroskopbeleuchtung (Weißlicht) so eingestellt, dass die Zelle gerade noch erkennbar war. Die dabei auf die Zelle einwirkende Lichtintensität betrug etwa $0,5 \text{ W/m}^2$. Eine Drehung der Zelle in Dunkelheit ist auf Grund der oben beschriebenen Schwierigkeiten nicht möglich. Höhere Lichtstärken (10 W/m^2) führen scheinbar zu einer leichten phasischen Depolarisation (Abb. 3.46). Im unteren Intensitätsbereich ist aber eine durch die Lichteinwirkung hervorgerufene Potentialverschiebung eher unwahrscheinlich. Die gemessenen maximalen Amplituden der Gravirezeptorpotentiale

von *Stylonychia* sind außerdem deutlich langsamer und haben eine größere Amplitude als die von Nakaoka et al. beschriebenen Photorezeptorpotentiale.

Auch wenn ein minimaler Einfluss der Beleuchtung auf die in den Reorientierungs-Experimenten gemessenen Potentialänderungen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, scheint es doch gerechtfertigt, die Messergebnisse als Gravirezeptorpotentiale zu interpretieren.

Thermorezeption

Bei *Paramecium* wurden von verschiedenen Autoren Untersuchungen zur Thermorezeption durchgeführt. Eine Kühlung der Zelle im anterioren Bereich führt zu einer Depolarisation und einem transienten Ca^{2+} -Einstrom (Kuriu et al. 1996). Eine Erwärmung im anterioren Bereich führt zu einer Depolarisation, im posterioren Bereich dagegen zu einer Hyperpolarisation der Zelle (Tominaga & Naitoh, 1994). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die thermosensitiven Kanäle wie die Mechanorezeptorkanäle bipolar auf der Zellmembran verteilt sind. Um einen möglichen Wärmeeffekt durch die Mikroskopbeleuchtung zu minimieren wurde das auf dem Kreutztisch des Mikroskops befestigte Bad temperiert und es wurde bei der geringst möglichen Beleuchtung gemessen (s.o.). Bei voll geöffneter Apertur- und Kondensorblende konnte eine Temperaturdifferenz zwischen dem Lichtkegel und dem restlichen Bad von $0,3^{\circ}\text{C}$ gemessen werden (nach 30 Minuten Bestrahlungsdauer). Nach dem Schließen der Aperturblende lag die Temperaturdifferenz außerhalb des Messbereiches des Thermometers ($0,05^{\circ}\text{C}$). Im Lichtkegel betrug die Temperaturdifferenz zwischen dem Boden des Bades und der Glasbrücke (5 mm) $0,1^{\circ}\text{C}$. Kuriu et al. (1996) haben bei *Paramecium* Thermorezeptorpotentiale mit einer Amplitude von 10 mV nach einer Temperaturerniedrigung von 25°C auf 20°C gemessen. Bei *Stylonychia* wurden Verschiebungen des Ruhepotentials von 1,5 mV pro 10°C gemessen (de Peyer & Macheimer, 1977). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass *Stylonychia* die Temperaturschwankungen in den vorliegenden Experimenten wahrgenommen hat.

4.6.2. Auswirkungen des Rezeptorpotentials

Die gemessenen Gravirezeptorpotentiale entsprechen den Forderungen der spezialisierten Statocystenhypothese. Aufwärts orientierte Zellen werden hyperpolarisiert, abwärts orientierte Zellen werden depolarisiert. Die gemessenen Potentialänderungen können innerhalb des Messbereiches als tonisch angesehen werden. Die langsamen Anstiegsraten von 0,03 mV/s weichen von den bei Mechanorezeptorpotentialen gemessenen ab (letztere haben typische Anstiegsraten von 2-3 mV/ms inaktivieren jedoch mit relativ hohen Zeitkonstanten). Dies deutet auf einen funktionellen Unterschied zwischen mechano- und gravisensitiven Kanälen hin, der auch schon bei der Interpretation der verhaltensphysiologischen Ergebnisse vermutet wurde (4.3.4.). Wie bereits erwähnt wäre es denkbar, dass (visko-)elastische Elemente des Cytoskeletes oder sekundäre Botenstoffe bei der Reiztransduktion involviert sind.

4.7. Schlussbetrachtung: Schwerkraftwahrnehmung bei Ciliaten

Bei schwimmenden Ciliaten konnten während der letzten Jahre in zahlreichen Versuchen sowohl Gravikinesen als auch Graviorientierungen nachgewiesen und analysiert werden (Machemer et al., 1991; Bräucker et al., 1994, Hemmersbach et al., 1997a). Da in der vorliegenden Arbeit auch bei einer auf Oberflächen laufenden Zelle Gravireaktionen nachgewiesen werden konnten, ist die Annahme nahe liegend, dass bei Ciliaten das generelle Prinzip der Schwerkraftwahrnehmung in einem Zusammenwirken von Gravikinese und Graviorientierung besteht. Die Gravikinese moduliert die Schwimmgeschwindigkeit und könnte daher (analog zur Photoorthokinese) als Graviorthokinese bezeichnet werden. Bei der Graviorientierung steht nach wie vor die Frage im Raum, ob es sich um einen physiologischen oder physikalischen Prozess handelt. Es gibt viele Indizien dafür, dass beide Mechanismen zusammenwirken: Eine ursächlich physikalische Ausrichtung der Zelle, die durch physiologische Vorgänge (Variation der Häufigkeit von Rich-

tungswechseln = „Graviklinokinese“ oder eine bisher für Ciliaten noch nicht nachgewiesene aktive Richtungsänderung) moduliert wird.

Mogami und Baba (1998) postulierten bei schwimmenden Ciliaten, eine ständige Änderung des Membranpotentials im Verlauf der Helixbahn, was letztlich zu einer Anhebung der Schwimmbahn und zu einer gravitaktischen Ausrichtung führen soll. Diese Hypothese ist jedoch auf Grund der langsamen Kinetik der gemessenen Gravirezeptorpotentiale eher unwahrscheinlich. *Stylonychia* ist in der Lage, auch ohne helikale Fortbewegung, eine Gravitaxis auszubilden.

Die spezialisierte Statocystenhypothese ist inzwischen durch zahlreiche Experimente unterstützt worden. Versuche in dichteangepassten Medien (Neugebauer et al. 1998), Erhöhung der cytoplasmatischen Last durch Fütterung mit Eisenpartikeln (Watzke, 2000), Messen der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten (Machemer et al., 1991) und nicht zuletzt der Nachweis von Gravirezeptorpotentialen bei *Paramecium* (Gebauer et al., 1999) und *Stylonychia* bestätigen dies.

Um die Relevanz schwerkraftabhängiger Reaktionen für einen Ciliaten in seinem Lebensraum zu beurteilen, reicht es allerdings nicht aus, diese isoliert zu betrachten. Wahrscheinlicher ist es, dass verschiedene Reizmodalitäten (Licht, Schwerkraft, chemische Reize) in ihrer Summe das Verhalten des Einzellers beeinflussen. Dies geschieht in einer komplexen und nicht immer einfach zu durchschauenden Weise und ist letztlich doch das Resultat der Verrechnung aller Rezeptorpotentiale auf der Ebene des Membranpotentials.

5. Zusammenfassung

Unter Anwendung von verhaltens- und elektrophysiologischen Methoden wurden Versuche zur Schwerkraftwahrnehmung des hypotrichen Ciliaten *Stylonychia mytilus* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zelle in der Lage ist, die Schwerkraft wahrzunehmen und ihre Wirkung durch Ausbildung einer Gravitaxis zu kompensieren. Die Gravireaktion besteht aus einer geschwindigkeitsmodulierenden, physiologischen Komponente (negative Gravikinese; „Graviorthokinese“) und einer ausrichtenden Komponente, die bei *Stylonychia* wahrscheinlich physikalischen Ursprungs ist, jedoch durch die Frequenz von häufig auftretenden Rück-Vor-Bewegungen physiologisch beeinflusst wird („Graviklinokinese“).

Das Verhalten in Zentrifugenexperimenten unterscheidet sich von dem anderer Ciliaten. Bei 1 g kann die Sedimentationsgeschwindigkeit zu 100% kompensiert werden. Diese Kompensationsfähigkeit nimmt im Bereich von 1,0 bis 1,2 g relativ stark ab und bleibt dann bei höheren Beschleunigungen mit etwa 80% konstant. Zwei Erklärungsansätze, entweder auf der Ebene des Rezeptorpotentials oder auf der Ebene der Gravirezeptorkanäle, werden zur Diskussion gestellt.

Nach einem Übergang in die Schwerelosigkeit (Fallturm) relaxiert die Gravikinese innerhalb von 4,75 Sekunden vollständig. Die Orientierung der Zellen wird herabgesetzt. Der schwerkraftunabhängige Vortrieb der Zelle beträgt 931 $\mu\text{m/s}$.

Stylonychia zeigt keine nachhaltige Beeinflussung des Bewegungsverhaltens nach einer kurzfristigen Erhöhung der Beschleunigung.

Die durch Einwirkung von Zentrifugalbeschleunigungen auf horizontal ausgerichtete Zellen ermittelten Schwellenwerte der Graviorientierung (0,4 g) und der Gravikinese (0,1 g) bedürfen noch der Absicherung durch weitere Experimente (z.B. Parabelflüge).

Durch elektrophysiologische Experimente konnte gezeigt werden, dass die bipolare Verteilung von mechanosensitiven Kanälen für die gesamte Membranoberfläche von *Stylonychia* gilt. Auf Grund der elektromotorischen Kopplung und durch den Nachweis einer allseitigen, bipolaren Verteilung von Mechanorezeptorkanälen bestehen auch bei *Stylonychia* die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der spezialisierten Statocystenhypothese.

Erstmals bei *Stylonychia* konnten Gravirezeptorpotentiale gemessen werden, die die Statocystenhypothese unterstützen. Abhängig von der Orientierung der Zelle zum Schwerkraftvektor werden, durch den Druck des Cytoplasmas auf die jeweils unten liegende Membran, de- oder hyperpolarisierende Änderungen des Membranpotentials induziert. Die gemessenen Gravirezeptorpotentiale haben maximale Amplituden von 4 mV und hohe Anstiegszeiten (0,03 mV/s). Die Anzahl der beteiligten Kanäle an der Gravitransduktion wird diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- Ammermann D. (1965): Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus* Ehrenberg. Arch. Protistenk. **108**: 109-152
- Ammermann D. (1971): Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*. Chromosoma **33**: 209-238
- Batschelet E. (1981): Circular statistics in Biology. In: Mathematics in Biology (Ed.: Sibson R., Cohen J.E.) Academic Press, London, New York: S. 3-353
- Bean B. (1984): Microbial geotaxis. In: Membranes and Sensory Transduction. (Ed.: Colombetti, G., Lenci, F.), Plenum Publishing Corporation, S. 163-198
- Blum J.J., Hayes A., Jamieson G.A., Vanaman T.C. (1980): Calmodulin confers calcium sensitivity on ciliary dynein ATPase. J. Cell Biol. **87**: 386-397
- Bonini N.M., Gustin M.C., Nelson D.L. (1986): Regulation of ciliary motility by membrane potential in *Paramecium*: A role for cyclic AMP. Cell Motil. Cytoskel. **6**: 256-272
- Bräucker R., Machemer-Röhnisch S., Machemer H., Murakami A. (1992): Gravity-controlled gliding velocity in *Loxodes*. Eur. J. Protistol., **28**: 238-245
- Bräucker R. (1994): New modules for microgravity experiments. In: Proc. CEBAS Workshops (Ed.: Bräucker R.), Bochum, 1994: S. 25-28
- Bräucker R., Machemer-Röhnisch S., Machemer H. (1994): Graviresponses in *Paramecium caudatum* and *Didinium nasutum* examined under varied hypergravity conditions. J. Exp. Biol. **197**: 271-294
- Bräucker R., Köhler R., Machemer H. (1996): Time dependence of gravitaxis and gravikinesis in *Paramecium caudatum*. In: Proc. CEBAS Workshops (Ed.: Bräucker R.), **12**: 161-167
- Bräucker R., Murakami A., Ikegaya K., Yoshimura K., Takahashi K., Machemer-Röhnisch S., Machemer H. (1998): Relaxation and activation of graviresponses in *Paramecium*. J. Exp. Biol., **201**: 2103-2113
- Bräucker R., Machemer H. (2002): CECILIA, a versatile research tool for cellular responses to gravity. Microgravity Sci. Technol. **13**: 3-13

- Bräucker R., Hemmersbach R. (2002): Ciliates as model systems for cellular graviperception. *ESA-SP* **501**: 31-34
- Brehm P., Eckert, R. (1978): Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* **202**: 1203-1205
- Brokaw C.J. (1972): Flagellar movement: a sliding filament model. *Science* **178**: 455-462
- Cogoli A., Cogoli-Greuter M. (1997): Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity. *Adv. Space Biol. Med.* **6**: 33-79
- Davenport C.B. (1897): Experimental morphology. Macmillan Publ. Co, New York, S. 1-509
- Deitmer J.W. (1982): The effects of tetraethylammonium and other agents on the potassium mechanoreceptor current in the ciliate *Stylonychia*. *J. Exp. Biol.* **96**: 239-249
- Deitmer J.W. (1983): Ca channels in the membrane of the hypotrich ciliate *Stylonychia*. In: The physiology of excitable cells (Ed.: Grinnell A., Moody W.J.), S. 51-63
- Deitmer J.W., Machemer H., Martinac B. (1983): Simultaneous recording of responses of membranelles and cirri in *Stylonychia* under membrane voltage-clamp. *J. Submicrosc. Cytol.* **15**: 285-288
- Deitmer J.W. (1984): Evidence for two voltage-dependent calcium currents in the membrane of the ciliate *Stylonychia*. *J. Physiol.* **355**: 137-159
- Deitmer J.W. (1986): Voltage dependence of two inward currents carried by calcium and barium in the ciliate *Stylonychia mytilus*. *J. Physiol.* **380**: 551-574
- de Peyer J., Machemer H. (1977): Membrane excitability in *Stylonychia*: Properties of the two-peak regenerative Ca-response. *J. Comp. Physiol.* **121**: 15-32
- de Peyer J.E., Machemer H. (1978): Hyperpolarizing and depolarizing mechanoreceptor potentials in *Stylonychia*. *J. Comp. Physiol.* **127**: 255-266
- de Peyer J., Deitmer J.W. (1980): Divalent cations as charge carriers during two functionally different currents in the ciliate *Stylonychia*. *J. Exp. Biol.* **88**: 73-89
- Dessen P., Zagulski M., Gromadka R., Plattner H., Kissmehl R., Meyer E., Betermier M., Schultz J.E., Linder J.U., Pearlman R.E., Kung C., Forney J., Satir B.H., Van Houten J.L., Keller A.M., Froissard M., Sperling L., Cohen J. (2001): *Paramecium* genome survey: a pilot project. *Trends Genet* **1(6)**:306-308

- Diehn B., Feinleib M., Haupt W., Hildebrand E., Lenci F. and Nultsch W. (1977): Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. *Photochem. Photobiol.* **26**: 559-560
- Dryl S. (1963): Contributions to mechanism of chemotactic response in *Paramecium caudatum*. *Animal Behaviour* **11**: 393-396
- Dunlap K. (1977): Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J. Physiol.* **271**: 119-133
- Eckert R., Randall D. (1986): Tierphysiology. Thieme Verlag
- Ehrenberg C.G. (1830): Beiträge zur Kenntniß der Organisation der Infusorien und ihrer geographischen Verbreitung, besonders in Sibirien. Abh. dt. Akad. Wiss. Berl. 1-154
- Fenchel T., Finlay B.J. (1986): The structure and function of muller vesicles in loxodid ciliates. *J. Protozool.* **33**: 69-77
- Foissner W., Blatterer H., Berger H., Kohlmann F. (1991): Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band I: Cytrophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Informationsberichte **1**: 315-322
- Fraenkel G.S., Gunn D.L. (1940): The orientation of animals. Oxford University Press, 2te Auflage (1961) Dover Publ. Inc., New York
- Freiberger N. (1997): Einfluss der Temperatur auf die Schwerkraftantworten von Protozoen. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Gebauer M., Watzke D., Machemer H. (1999): The gravikinetik response of *Paramecium* is based on orientation-dependent mechanotransduction. *Naturwiss.* **86**: 352-356
- Gebauer M. (2000): Bedingungen für den Nachweis von Gravirezeptorpotentialen bei *Paramecium caudatum*. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
- Häder D.-P., Lebert M. (1985): Real time computer-controlled tracking of motile microorganisms. *Photochem. Photobiol.* **42**: 509-514
- Häder D.-P. (1987): Polarotaxis, gravitaxis and vertical phototaxis in the green flagellate, *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* **147**: 179-183

- Häder D.-P., Liu S.-M. (1990): Motility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*, impaired by artificial and solar UV-B radiation. Curr. Microbiol. **21**: 161-168
- Häder D.-P., Rosum A., Schäfer J., Hemmersbach R. (1995): Gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis* is controlled by an active gravireceptor. J. Plant. Physiol. **146**: 474-480
- Häder D.-P., Hemmersbach R. (1997): Graviperception and graviorientation in flagellates. Planta **203**: 7-10
- Happel J., Brenner H. (1986): Low Reynolds number hydrodynamics. 4. Aufl., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, S. 1-553
- Hara R., Asai H. (1980): Electrophysiological responses of *Didinium nasutum* to *Paramecium* capture and mechanical stimulation. Nature **283**: 869-870
- Hemmersbach R., Voormanns R., Briegleb W., Rieder N., Haeder D.-P. (1996): Influence of accelerations on the spatial orientation of *Loxodes* and *Paramecium*. J. Biotechnol. **47(2-3)**: 271-278
- Hemmersbach R. (1997): Schwerkraftinduziertes Verhalten bei Protozoen und Perzeptionshypothesen. Habilitationsschrift an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Hemmersbach R., Voormanns R., Bromeis B., Schmidt, N., Rabien H., Ivanova K. (1997a): Comparative studies of the graviresponses of *Paramecium* and *Loxodes*. Adv. Space Res. **21**:1285-1289
- Hemmersbach R., Becker E., Stockem W. (1997b): Influence of extremely low frequency electromagnetic fields on the swimming behavior of ciliates. Bioelectromagnetics **18(7)**: 491-498
- Hemmersbach R., Bromeis B., Bräucker R., Krause M., Freiburger N., Stieber C., Wilczek M. (2001): *Paramecium* - a modell system for studying cellular graviperception. Adv. Space. Res. **27(5)**: 893-898
- Hemmersbach-Krause R., Briegleb W. and Häder D.-P. (1991): Dependence of gravitaxis in *Paramecium* on oxygen. Europ. J. Protistol. **27**: 278-282.
- Hemmersbach-Krause R., Briegleb W. (1992): Gravitational effects on *Paramecium* and *Loxodes*. The Physiologist **35**: 23-26

- Hemmersbach-Krause R., Briegleb W., Vogel K., Häder D.-P. (1993a): Swimming velocity of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. *Acta Prot.* **32**: 229-236
- Hemmersbach-Krause R., Briegleb W., Haeder D.-P., Vogel K., Grothe D., Meyer I. (1993b): Orientation of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. *J. Euk. Microbiol.* **40(4)**: 439-446
- Hennessey T., Machemer H., Nelson D.L. (1985): Injected cyclic AMP increases ciliary beat frequency in conjunction with membrane hyperpolarization. *Eur. J. Cell Biol.* **36**: 153-156
- Hinrichsen R.D. and Schultz J.E. (1988): *Paramecium*: A model system for the study of excitable cells. *TINS* **11**: 27-32
- Howard J., Roberts W.M., Hudspeth A.J. (1988): Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys.* **17**: 99-124
- Hughes-Fulford M., Lewis M.L. (1996): Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp. Cell Res.* **224(1)**: 103-109
- Ivens I., Deitmer J.W. (1986): Inhibition of a voltage-dependent Ca current by concanavalin A. *Pflügers Arch.* **406**: 212-217.
- Iwatsuki K., Naitoh Y. (1982): Photoresponses in colorless *Paramecium*. *Experientia* **38**: 1453-1454
- Izumi A., Nakaoka Y. (1987): cAMP-mediated inhibitory effect of calmodulin antagonists on ciliary reversal of *Paramecium*. *Cell Motil. Cytoskel.* **17**: 154-160
- Jensen P. (1891): Über den Geotropismus niederer Organismen. *Physiol. Inst. Jena*, S. 428-480
- Kowalewski U., Bräucker R., Machemer H. (1998): Responses of *Tetrahymena pyrifomis* to the natural gravity vector. *Microgravity sci. technol.* **11**: 167-172
- Krause M. (1999) Elektrophysiologie, Mechanosensitivität und Schwerkraftbeantwortung von *Bursaria truncatella*. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
- Krueppel T., Furchbrich V., Lueken W. (1993): Electrical responses of the marine ciliate *Euplotes vannus* (Hypotrichia) to mechanical stimulation at the posterior cell end. *J. Membr. Biol.* **135(3)**: 253-260

- Kuhlmann H.-W. (1993): Life cycle dependent phototactic orientation in *Ophryoglena catenula*. Europ. J. Protistol. **29**: 344-352
- Kuriu T., Nakaoka Y., Oosawa Y. (1996): Cold-sensitive Ca^{2+} influx in *Paramecium*. J. Membr. Biol. **154**(2): 163-167
- Kuroda K., Kamiya N. (1989): Propulsive force of *Paramecium* as revealed by the video centrifuge microscope. Exp. Cell Res. **184**: 268-272
- Lacampagne A., Gannier F., Argibay J., Garnier D., Le Guennec J.-Y. (1994): The stretch-activated ion channel blocker gadolinium also blocks L-type calcium channels in isolated ventricular myocytes of the guinea-pig. Biochem. Biophys. Acta **1191**: 205-208
- Larsen J., Satir P. (1991): Analysis of Ni^{2+} -induced arrest of *Paramecium* axonems. J. Cell Sci. **99**: 33-40
- Lewis M.L. (2002): The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. In: Cell. Biol. Biotech. in Space (Ed.: Cogoli A.) Elsevier, Amsterdam, S. 77-128
- Lyon E.P. (1905): On the theory of geotropism in *Paramecium*. Am. J. Physiol. **14**: 421-432
- Machemer H. (1965a): Analyse langzeitlicher Bewegungserscheinungen des Ciliaten *Stylonychia mytilus* Ehrenberg. Arch. Protistenkd. **108**: 91-107
- Machemer H. (1965b): Analyse kurzzeitlicher Bewegungserscheinungen des Ciliaten *Stylonychia mytilus* Ehrenberg. Arch. Protistenkd. **108**: 153-190
- Machemer H. (1966a): Versuche zur Frage nach der Dressierbarkeit hypotricher Ciliaten unter Einsatz hoher Individuenzahlen. Z. Tierpsychol. **6**: 641-654
- Machemer H. (1966b): Erschütterungsbedingte Sensibilisierung gegenüber rauhem Untergrund bei *Stylonychia mytilus*. Arch. Protistenkd. **109**: 245-256
- Machemer H. (1970): Korrelation zwischen Membranpotential und Fortbewegung bei *Stylonychia*. Naturwiss. **57**: 398-399
- Machemer H. (1974): Ciliary activity and metachronism in protozoa. In: Cilia and Flagella, (Ed.: Sleight M.A.), 199-286, Academic Press New York, London

- Machemer H. (1975): Modification of ciliary activity by the rate of membrane potential changes in *Paramecium*. J. Comp. Physiol. **101**: 343-356
- Machemer H., Ogura A. (1979): Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliated *Paramecium*. J. Physiol. **296**: 49-60
- Machemer H., de Peyer J. (1982): Analysis of ciliary beating frequency under voltage clamp control of the membrane. Cell Motility Suppl. **1**: 205-210
- Machemer H., Machemer-Röhnisch S. (1984): Mechanical and electric correlates of mechanoreceptor activation of the ciliated tail in *Paramecium*. J. Comp. Physiol. **154**: 273-278
- Machemer, H. (1986): Electromotor coupling in cilia. In: Membrane control of cellular activity (Ed.: Lüttgau H.C.) Fortschr. Zool. **33**: 205-250
- Machemer H., Deitmer J.W. (1987): From structure to behaviour: *Stylonychia* as a model system for cellular physiology. In: Progress in Protistology (Ed.: Corliss J.O., Patterson D.J) Biopress, Bristol: S. 86-110
- Machemer H. (1988): Electrophysiology. In: *Paramecium* (Ed.: Görtz H.D.), Springer, S. 185-215
- Machemer H. (1989): Cellular behaviour modulated by ions: Electrophysiological implications. J. Protozool. **36(5)**: 463-487
- Machemer H. (1990): Bioelectric control of the ciliary cycle. (Ed.: Alt W., Hoffmann G.) Biol. Motion. Proceed., Workshop, Königsw. 1989, Lect. Notes Biomath. **89**: 169-183
- Machemer H., Machemer-Röhnisch S., Bräucker R., Takahashi K. (1991): Gravikinesis in *Paramecium*: Theory and isolation of a physiological response to the natural gravity vector. J. Comp. Physiol. A **168**: 1-12
- Machemer H., Bräucker R., Takahashi K., Murakami A. (1992): Short-term microgravity to isolate graviperception in cells. Microgravity Sci. Technol. **5**: 119-123
- Machemer H., Bräucker R. (1992): Gravireception and graviresponses in ciliates. Acta Protozool. **31**: 185-214

- Machemer H., Bräucker R., Murakami A., Yoshimura K. (1993a): Gravi-perception in unicellular organisms: a comparative behavioural study under short-term microgravity. *Microgravity Sci. Technol.* **5**: 221-231.
- Machemer H., Machemer-Röhnisch S., Bräucker R. (1993b): Velocity and graviresponses in *Paramecium* during adaptation and varied oxygen concentration. *Arch. Protistenkd.* **143**: 285-296
- Machemer H., Bräucker R. (1996): Gravitaxis screened for physical mechanism using g-modulated orientational cellular behaviour. *Microgravity Sci. Technol.* **9**: 2-9
- Machemer H., Nagel U., Bräucker R. (1997): Assessment of g-dependent cellular gravitaxis: Determination of cell orientation from locomotion track. *J. Theor. Biol.* **185**(2): 201-211
- Machemer H. (1998a): Electric potentiation of gravikinesis in *Paramecium* is possibly mediated by filaments. *Adv. Space Res.* **21**: 1301-1309
- Machemer H. (1998b): Unicellular responses to gravity transitions. *Space Forum*, **3**: 3-44
- Machemer H., Bräucker R., Machemer-Röhnisch S., Nagel U., Neugebauer D.-Ch., Weskamp M. (1998): The linking of extrinsic stimuli to behaviour; roles of cilia in ciliates. *Eur. J. Protistol.* **34**: 254-261
- Machemer-Röhnisch S., Bräucker R., Machemer H. (1993): Neutral gravitaxis of gliding *Loxodes* exposed to normal and raised gravity. *J. Comp. Physiol. A* **171**: 779-790
- Machemer-Röhnisch S., Bräucker R., Machemer H. (1998a): Graviresponses of gliding and swimming *Loxodes* using step transition to weightlessness. *J. Euk. Microbiol.* **45**: 411-418
- Machemer-Röhnisch S., Bräucker R., Machemer H. (1998b): Relaxation of graviresponses of the ciliate *Didinium* following step transition to the weightless condition. *Microgravity Sci. Technol.* **11**: 35-43
- Machemer-Röhnisch S., Nagel U., Machemer H. (1999): A gravity-induced regulation of swimming speed in *Euglena gracilis*. *J. Comp. Physiol. A* **185**: 517-527
- McNab R.M., Koshland E.D. (1972): The gradient sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2509-2512

- Mogami Y., Machemer H. (1990): Ca-Mg control of ciliary motion: a quantitative model study. (Ed.: Alt W., Hoffmann G.) Biol. Motion. Proceed. Workshop, Königsw. 1989, Lect. Notes Biomath. **89**: 184-194
- Mogami Y., Machemer H. (1991): In-vivo activation of cirral movement in *Stylonychia* by calcium. J. Comp. Physiol. A **168**: 687-695
- Mogami Y., Baba S.A. (1998): Super-helix model: A physiological model for gravitaxis of *Paramecium*. Adv. Space Res. **21**: 1291-1300
- Monzer J. (1996): Cellular graviperception in the basidiomycete *Flammulina velutipes* - Can the nuclei serve as fungal statoliths? Eur. J. Cell. Biol. **71**(2): 216-220
- Murakami A. (1998): Short-term responses of gravitaxis to altered gravity in *Paramecium*. Adv. Space Res. **21**: 1253-1261
- Nagel U., Watzke D., Neugebauer D.-Ch., Machemer-Röhnisch S., Bräucker R., Machemer H. (1997): Analysis of Sedimentation of Immobilized Cells under Normal and Hypergravity. Microgravity Sci. Technol. **10**: 41-52
- Nagel U. (1998): Mechanismen physiologischer Schwerkraftbeantwortung beim Wildtyp und einer Mutante von *Paramecium tetraurelia*. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
- Nagel U., Machemer H. (2000a): Physical and physiological components of the graviresponses of wild-type and mutant *Paramecium tetraurelia*. J. Exp. Biol. **6**: 1059-70
- Nagel U., Machemer H. (2000b): Effects of gadolinium on electrical membrane properties and behaviour in *Paramecium tetraurelia*. Europ. J. Protistol. **36**: 161-168
- Naitoh Y., Eckert R. (1972): Electrophysiology of ciliate protozoa. Exp. Physiol. Biochem. **5**: 17-31
- Naitoh Y., Eckert R. and Friedman K. (1972): A regenerative calcium response in *Paramecium*. J. Exp. Biol. **56**: 667-681
- Naitoh Y., Eckert R. (1974): The control of ciliary activity in protozoa. In: Cilia and Flagella (Ed.: Sleight M.A) **12**: 305-352
- Nakaoka Y., Kinugawa K., Kurotani, T. (1987): Ca²⁺-dependent photoreceptor potential in *Paramecium bursaria*. J. Exp. Biol. **131**: 107-115

- Nakaoka Y. (1989): Localization of photosensitivity in *Paramecium bursaria*. J. Comp. Physiol. A, **165**(5): 637-641
- Nakaoka Y., Tokioka R., Shinozawa T., Fujita J., Usukura J. (1991): Photoreception of *Paramecium* cilia: Localization of photosensitivity and binding with anti-frog-rhodopsin IgG. J. Cell. Sci. **99**(1): 67-72
- Nowakowska G., Grebecki A. (1977): On the mechanism of orientation of *Paramecium caudatum* in the gravity field. II. Contributions to a hydrodynamic model of geotaxis. Acta Protozool. **16**: 359-376
- Neugebauer D.Ch., Machemer-Röhnisch S., Nagel U., Bräucker R., Machemer H. (1998): Evidence of central and peripheral gravireception in the ciliate *Loxodes*. J. Comp. Physiol. A **183**: 303-311
- Ogura A., Machemer H. (1980): Distribution of mechanoreceptor channels in the *Paramecium* surface membrane. J. Comp. Physiol. **135**: 233-242
- Ogura A. (1981): Deciliation and reciliation in *Paramecium* after treatment with ethanol. Cell Structure and Function **6**: 43-50
- Oka T., Nakaoka Y., Oosawa F. (1986): Changes in membrane potential during adaptation to external potassium ions in *Paramecium caudatum*. J. Exp. Biol. **126**: 111-119
- Ooya M., Mogami Y., Okuno N., Yamashita M., Baba S.A. (1988): Swimming behavior of *Paramecium* at microgravity and hypergravity. Annual Meeting JSBSS 1988
- Plattner H., Klauke N. (2001): Calcium in ciliated protozoa: sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. Int. Rev. Cytol. **201**:115-208
- Roberts, A.M. (1970): Geotaxis in motile micro-organisms. J. Exp. Biol. **53**: 687-699
- Sachs L. (1984): Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. Springer, 6. Auflage: S. 1-552
- Satir P. (1973): Structural basis of ciliary activity. In: Behaviour of Microorganisms, 214-228
- Satow Y., Kung C. (1979): Voltage sensitive Ca-channels and the transient inward current in *Paramecium tetraurelia*. J. Exp. Biol. **78**: 149-161
- Schultz J.E., Grünemund R., Hirschhausen R. von, Schönefeld U. (1984): Ionic regulation of cyclic AMP levels in *Paramecium tetraurelia* in vivo. FEBS Lett. **167**: 113-116

- Shi X.B., Frankel J. (1990): Morphology and development of mirror-image doublets of *Stylonychia mytilus*. J. Protozool. **37**(1):1-13
- Sievers A., Volkmann D. (1979): Gravitropism in single cells. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Physiology of Movements (Ed.: Haupt W., Feinleib M.E.), **7**: 567-572, Springer
- Sokabe M., Sachs F. (1992): Chapter 4 - Towards molecular mechanism of activation in mechanosensitive ion channels. Advances Comp. Environm. Physiol., Springer, **10**: 55-77
- Stallwitz E., Häder D.-P. (1994): Effects of heavy metals on motility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*. Europ. J. Protistol. **30**: 18-24
- Tabony J., Glade N., Papaseit C., Demongeot J. (2002): Gravity dependence of microtubule preparations. J. Grav. Physiol. **9**(1): 245-248
- Taneda K. (1987): Geotactic behavior in *Paramecium caudatum*. I. Geotaxis assay of individual specimen. Zool. Science. **4**: 781-788
- Tominaga T., Naitoh Y. (1994): Comparison between thermoreceptor and mechanoreceptor currents in *Paramecium caudatum*. J. Exp. Biol. **189**: 117-131
- Van Houten J., Hansma H., Kung C. (1975): Two quantitative assays for chemotaxis in *Paramecium*. J. Comp. Physiol. **104**: 211-223
- Verworn M. (1889): Psychophysiologische Protistenstudien. Exp. Unters. Jena, Fischer, 1-219
- Watzke D. (2000): Experimentelle Beeinflussung der gravisensorischen Transduktion bei *Paramecium caudatum*. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
- Wilczek M. (2001): *Paramecium biaurelia* im niederfrequenten Magnetfeld: Auswirkungen auf das Schwimmverhalten, die cAMP-, cGMP- und 5'-Methoxytryptamin-Konzentrationen. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Winet H. (1973): Wall drag on free-moving ciliated microorganisms. J. Exp. Biol. **59**: 753-766

- Winet H., Jahn T.L. (1974): Geotaxis in protozoa. I. A propulsion gravity model for *Tetrahymena* (ciliata). J. Theor. Biol. **46**: 449-465
- Wood D.C. (1970): Electrophysiological studies of the protozoan, *Stentor coeruleus*. J. Neurobiol. **1**: 363-377
- Yoshimura K. (1996): A novel type of mechanoreception by the flagella of *Chlamydomonas*. J. Exp. Biol. **199(2)**: 295-302

Abkürzungsverzeichnis

g	Erdbeschleunigung (Abgeleitete SI-Einheit ($1\text{ g} = 9,81\text{ ms}^{-2}$))
μg	Mikrogravitation
Δ	Gravikinetische Komponente [$\mu\text{m/s}$]
a_c	Zentrifugalbeschleunigung [g]
a_g	Erdbeschleunigung [g]
a_r	Aus a_g und a_c resultierender Beschleunigungsvektor (Bei 1 g ist $a_r = a_g$)
Δ_D	Gravikinese der sich parallel zu a_r fortbewegenden Zellen [$\mu\text{m/s}$]
Δ_U	Gravikinese der sich antiparallel zu a_r fortbewegenden Zellen [$\mu\text{m/s}$]
P	schwerkraftunabhängiger Vortrieb einer Zelle [$\mu\text{m/s}$]
p	Irrtumswahrscheinlichkeit aus statistischen Tests
R	Korrelationskoeffizient
r	Maß für die Gerichtetheit einer Population, nicht auf die Reizrichtung bezogen
r_o	Orientierungskoeffizient ($-1 \leq r_o \leq 1$), auf die Reizrichtung bezogen
S	Sedimentationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]
V_D	Geschwindigkeit der sich parallel zu a_r fortbewegenden Zellen [$\mu\text{m/s}$]
V_H	Geschwindigkeit der sich rechtwinkelig zu a_r fortbewegenden Zellen [$\mu\text{m/s}$]
V_U	Geschwindigkeit der sich antiparallel zu a_r fortbewegenden Zellen [$\mu\text{m/s}$]
N	Datenzahl
β_i	Winkel der individuellen Fortbewegungsrichtung
V_M	Membranpotential [mV]
R_E	Eingangswiderstand [$\text{M}\Omega$]
C_E	Eingangskapazität [nF]
τ	Zeitkonstante [ms]
TEA	<u>T</u> etra <u>e</u> thylammonium

Anhang

Tab A.1: Im Rahmen der Arbeit eingesetzte Kultur- und Experimentierlösungen

Lösung	CaCl ₂	KCl	Tris-HCl	Na ⁺	Mg ²⁺	Ni ²⁺
Pringsheim	0,85 mM	0,25 mM	-	0,59 mM	0,08 mM	
Tris-1-1-1	1 mM	1 mM	1 mM	-	-	-
Nickellösung	1 mM	1 mM	1 mM	-	-	2 mM

Tab A.2: Für die Kultivierung von *Chlorogonium elongatum* verwendetes *Euglena*-Medium (Rezept für 1000 ml, mit A. bidest. aufzufüllen).

Substanz	Menge	Bemerkung
Natrium-Acetat	1,0 g	
Beef-Extrakt	1,0 g	
Trypton	2,0 g	
Yeast-Extrakt	2,0 g	
Erd-Lösung	20 ml	Erdauszug, auf pH 7,2 gepuffert
KNO ₃	0,2 g	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,02 g	
MgSO ₄	0,01 g	
CaSO ₄	20 ml	gesättigte Lösung

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Zusammenhang zwischen resultierender und Zentrifugalbeschleunigung	30
Tab. 3.1	Daten zur Zellgeometrie von <i>Stylonychia mytilus</i>	50
Tab. 3.2	Berechnung der Membranoberfläche	51
Tab. 3.3	Berechnung des Zellvolumens	52
Tab. 3.4	Mediane Sedimentationsgeschwindigkeiten bei verschiedenen g-Stufen	56
Tab. 3.5	Häufigkeiten vertikal und horizontal sedimentierender Zellen	56
Tab. 3.6	Richtungsabhängige Geschwindigkeiten von <i>Stylonychia</i>	64
Tab. 3.7	Gravikinesewerte	65
Tab. 3.8	Gravikinesewerte bei Beschleunigungen von 1,0 g bis 1,2 g	70
Tab. 3.9	Elektrophysiologische Eigenschaften von <i>Stylonychia mytilus</i>	93
Tab. 3.10	Maximale Amplitude des Gravirezeptorpotentials	103
Tab. 4.1	Vergleich der Werte für den schwerkraftunabhängigen Vortrieb P	136
Tab. 4.2	Elektrophysiologische Daten früherer und aktueller Messungen	141
Tab. A.1	Verwendete Kultur- und Experimentierlösungen	170
Tab. A.2	Kulturmedium <i>Chlorogonium elongatum</i>	170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Vergleich der Cilienaktivität bei <i>Stylonychia</i> und <i>Paramecium</i>	8
Abb. 1.2	Spezialisierte Statocystenhypothese übertragen auf <i>Stylonychia</i>	15
Abb. 2.1	<i>Stylonychia mytilus</i> in ventraler und lateraler Darstellung	19
Abb. 2.2	Experimentierkammer	22
Abb. 2.3	zeitlicher Ablauf der Fallturmexperimente	25
Abb. 2.4	CECILIA - Drehtisch mit drehbarer Kammerhalterung	27
Abb. 2.5	CECILIA - Drehtisch mit statischer Kammerhalterung	28
Abb. 2.6	zeitlicher Ablauf der Versuche bei erhöhter Beschleunigung	29
Abb. 2.7	Kanalaktivierung durch Erd- und Zentrifugalbeschleunigung	31
Abb. 2.8	zeitlicher Ablauf der Versuche bei Zentrifugalbeschleunigung	31
Abb. 2.9	Versuchsablauf zur Nachwirkung erhöhter Beschleunigung	32
Abb. 2.10	zeitlicher Ablauf der Adaptationsversuche	35
Abb. 2.11	zeitlicher Ablauf der Stoßversuche	36
Abb. 2.12	Versuchskammer für elektrophysiologische Experimente	38
Abb. 2.13	Messung von Gravirezeptorpotentialen	43
Abb. 2.14	Sektoren zur Bestimmung der richtungsabhängigen Geschwindigkeiten	45
Abb. 3.1	Klassenhäufigkeitsdiagramm der Zelllänge und -breite	51
Abb. 3.2	Klassenhäufigkeitsdiagramm der Sedimentationsgeschwindigkeit	53
Abb. 3.3	zeitliche Veränderung der Sedimentationsgeschwindigkeit	54
Abb. 3.4	Sedimentationsgeschwindigkeit bei verschiedenen g-Stufen	55
Abb. 3.5	Aktivität von <i>Stylonychia</i> in verschiedenen Lösungen	57
Abb. 3.6	Geschwindigkeit von <i>Stylonychia</i> in verschiedenen Lösungen	58
Abb. 3.7	Orientierung von <i>Stylonychia</i> in verschiedenen Lösungen	59
Abb. 3.8	Gravikinese von <i>Stylonychia</i> in verschiedenen Lösungen	60
Abb. 3.9	Stoßversuche (Geschwindigkeitsveränderung)	62
Abb. 3.10	Polarhistogramme der Orientierung und Geschwindigkeiten bei 1 g	63
Abb. 3.11	Geschwindigkeiten von <i>Stylonychia</i> bei verschiedenen Beschleunigungen	66
Abb. 3.12	Um S korrigierte richtungsabhängige Geschwindigkeiten	67
Abb. 3.13	Differenzen der Auf- und Abwärtslaufgeschwindigkeiten	68
Abb. 3.14	Gravikinese von <i>Stylonychia</i> bei verschiedenen Beschleunigungen	69
Abb. 3.15	Kompensation der Sedimentationsgeschwindigkeit	70
Abb. 3.16	Polarhistogramme der Orientierung bei verschiedenen g-Stufen	71
Abb. 3.17	Abhängigkeit der Orientierung von der Beschleunigung	72
Abb. 3.18	Nachwirkungen erhöhter Beschleunigungen auf die Gravikinese	73

Abb. 3.19	Nachwirkungen erhöhter Beschleunigungen auf die Graviorientierung	74
Abb. 3.20	Geschwindigkeiten in Abhängigkeit zur Zentrifugalbeschleunigung	75
Abb. 3.21	um S korrigierte Zentrifugal- und Zentripetalgeschwindigkeiten	76
Abb. 3.22	Abhängigkeit der Gravikinese von der Zentrifugalbeschleunigung	77
Abb. 3.23	Abhängigkeit der Orientierung von der Zentrifugalbeschleunigung	78
Abb. 3.24	Relative Häufigkeiten laufender und schwimmender Zellen	79
Abb. 3.25	Analyse der Reversalhäufigkeit bei 1 g und μg	79
Abb. 3.26	Polarhistogramme laufender Zellen bei 1 g und μg	80
Abb. 3.27	Polarhistogramme schwimmender Zellen bei 1 g und μg	81
Abb. 3.28	richtungsabhängige Geschwindigkeiten beim Übergang 1 g zu μg	82
Abb. 3.29	Relaxation der Gravikinese beim Stufenübergang von 1 g nach μg	83
Abb. 3.30	Ableitung des Membranpotentials mit spontanen Aktionspotentialen	85
Abb. 3.31	Beispiele für Konstantstrominjektionen	85
Abb. 3.32	Zeit bis zum Erreichen des Spitzenpotentials	86
Abb. 3.33	späte Potentialänderungen in Abhängigkeit von der Stromstärke	87
Abb. 3.34	frühe Potentialänderungen (Aktionspotential, gradierte Komponente)	88
Abb. 3.35	frühe Potentialänderungen (Alles-oder-Nichts Komponente)	89
Abb. 3.36	Beispiele für Ableitungen in der Spannungsklemme	90
Abb. 3.37	späte Transmembranströme in Abhängigkeit von der Stufenspannung	91
Abb. 3.38	frühe Transmembranströme in Abhängigkeit von der Stufenspannung	92
Abb. 3.39	Beispiele für Mechanorezeptorpotentiale	94
Abb. 3.40	Statistische Auswertung (ventrale, dorsale und laterale Reizung)	96
Abb. 3.41	Langzeitableitung des Membranpotentials ohne Drehung	99
Abb. 3.42	depolarisierende Gravirezeptorpotentiale (Beispiele)	100
Abb. 3.43	depolarisierenden Gravirezeptorpotentiale (statistische Auswertung)	102
Abb. 3.44	hyperpolarisierende Gravirezeptorpotentiale (Beispiele)	104
Abb. 3.45	hyperpolarisierenden Gravirezeptorpotentiale (statistische Auswertung)	105
Abb. 3.46	Auswirkung starker Beleuchtung auf das Membranpotential	106
Abb. 4.1	Hypothese I zur Erklärung des Verhaltens von <i>Stylonychia</i> bei Hyper-g	125
Abb. 4.2	Hypothese II zur Erklärung des Verhaltens von <i>Stylonychia</i> bei Hyper-g	126

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Bleckmann und Frau PD. Dr. R. Hemmersbach für ihre Unterstützung und dafür, dass sie sich bereiterklärt haben, die vorliegende Arbeit zu betreuen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Bräucker für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, für seine Hilfe bei Problemen, für die Bereitstellung von Computerprogrammen und für viele aufmunternde Worte.

Allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Luft und Raumfahrtmedizin, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben, und sei es durch das Schaffen eines guten Arbeitsklimas, soll an dieser Stelle gedankt sein.

Frau Dr. D. Watzke danke ich für die hilfreiche Überlassung ihrer gesammelten Literaturbestände.

Ich möchte auch Herrn Prof. Dr. R. Gerzer für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre Hilfe danken und meiner Lebensgefährtin, Stefanie, für ihre Geduld und ihr Verständnis während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren	am 25.12.1973 in Wanne-Eickel (jetzt Herne)
Eltern	Edeltraud Krause, Helmut Krause
Familienstand	ledig

Schulischer Werdegang

1980 - 1984	Grundschule an der Claudiusstrasse, Herne
1984 - 1993	Städt. Gesamtschule Stöckstrasse, Herne
18. Juni 1993	Abitur

Studium

1993 - 1999	Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
12. Februar 1999	Diplom in Biologie in den Fächern Zoologie, Mikrobiologie, Immunologie

Anstellungen

1995 - 1998	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl Allg. Zoologie und Neurobiologie, Universität Bochum
1999	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Allg. Zoologie und Neurobiologie, Universität Bochum
1999 – 2002	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zoologie, Universität Bonn
seit 2002	Wissenschaftliche Hilfskraft am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt, Köln